

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-301893

(43)公開日 平成5年(1993)11月16日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00		8619-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
5/10				
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		7236-4B	5/ 00	B

審査請求 未請求 請求項の数11(全 36 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-3399	(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22)出願日	平成4年(1992)1月10日	(72)発明者	成尾 憲一 兵庫県三田市南が丘1丁目1番2号
(31)優先権主張番号	特願平3-20860	(72)発明者	瀬古 智佐子 大阪府高槻市塚原1丁目7番9-306号
(32)優先日	平3(1991)2月14日	(72)発明者	黒川 勉 兵庫県川西市水明台1丁目1番地の50
(33)優先権主張国	日本(JP)	(72)発明者	近藤 達也 東京都文京区本駒込5丁目4番6-1201号
(31)優先権主張番号	特願平3-224454	(74)代理人	弁理士 大多和 明敏 (外1名)
(32)優先日	平3(1991)9月4日		
(33)優先権主張国	日本(JP)		

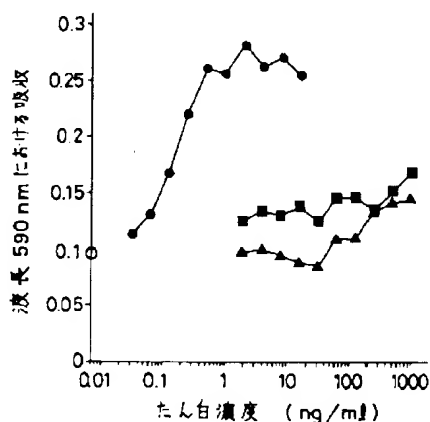
(54)【発明の名称】 グリア活性化因子およびその製造法

(57)【要約】

【目的】 グリア細胞に特異的に増殖促進および栄養活性作用を有する新規な因子を見出すと共に、このものを効率よく製造する方法を提供する。

【構成】 ヒト由来グリオーマ細胞株を培養した細胞培養上清から、ラット脳細胞からのグリア細胞増殖活性を指標としてグリア活性化成長因子を単離、精製し、それをコードするcDNAの塩基配列、それから推定されるアミノ酸配列を解明すると共に、遺伝子工学的にGAFを発現した。

【効果】 本発明で得られたグリア活性化因子は新規な蛋白質で、グリア細胞、線維芽細胞に対し増殖活性を有し、脳疾患改善薬等の医薬として用いることが期待できる。



▲ : rhGAF 添加群
■ : rhGAF およびヘパリン (20 µg/ml) 添加群
● : bFGF 添加群
○ : 無添加群

【特許請求の範囲】

【請求項1】 グリオーマ細胞培養液より得られ、かつグリオーマ細胞増殖促進活性を有する蛋白質であるグリア活性化因子。

【請求項2】 グリオーマ細胞がヒトグリオーマ細胞である請求項1記載のグリア活性化因子

【請求項3】 アミノ酸配列：

Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp

で示されるポリペプチドを含むグリア活性化因子または該因子作用を有するそのペプチド。

【請求項4】 アミノ酸配列：

(Met)n-XI-Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp -X2

〔ただしnは0または1を、X1は Ala Pro Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly Pro Ala Val Thr Asp またはその断片

を、X2は Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser またはその断片を、それぞれ示す〕で示されるポリペプチドからなる請求項3記載のグリア活性化因子

【請求項5】 アミノ酸配列：

(Met)n-X3 Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

〔ただしnは0または1を、X3は Ala Pro もしくは Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu Leu またはその断片を、それぞれ示す〕で示されるポリペプチドからなる請求項3記載のグリア活

性化因子。

【請求項6】 グリア活性化因子をコードするポリヌクレオチドを含有するDNA。

【請求項7】 ポリヌクレオチドが塩基配列：

TTG GATCATTTAA AGGGGATTCT
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCATT CTGGAATTIA TCAGTATAGC

AGTGGGCTG GTCAGCATTC GAGGCGTGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA
GCGGGAGCTG TATCGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTCCGA
AGAAAACCTGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTAATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG
ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA
CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGCACCC GAC

で示されるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチ

【請求項8】ポリヌクレオチドが塩基配列：

ドである請求項6記載のDNA

Y1-TTG GATCAATTAA AGGGGATTC
CAGGCGGAGG CAGCTAATC GCAGGACTGG ATTCACTTAA GAAATCTTCC CCAATGATAC
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCAIT CTGGAATTTA TCAGTATAGC
AGTGGGCTG GTCAGCATTC GAGGCGTGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA
GCGGGAGCTG TATCGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTCCGA
AGAAAACCTGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTAATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG
ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA
CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGCACCC GAC

〔ただし、Y1は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTTT CGG
TGTGCAG GATGCGGTAC CGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCCGTG
G ACAGCCCGGT TTGTTAAGT GACCACTTGG GTCAGTCCGA AGCA
GGGGGG CTCCCAAGGG GACCCGAGT CAGGAC またはその断
片を、Y2はAAAAGTAC CTGAACGTGA TAAGGATATT CTAAGCCAAA

GT またはその断片を、それぞれ示す〕ないしその5'
末端に開始コードATG を含有する塩基配列で示されるポ
リヌクレオチドである請求項6記載のDNA

【請求項9】ポリヌクレオチドが塩基配列：

Y3-AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA
AGCAGGGGGG CTCCCAAGGG GACCCGAGT CACGACTTG GATCAATTAA AGGGGATTC
CAGGCGGAGG CAGCTAATC GCAGGACTGG ATTCACTTAA GAAATCTTCC CCAATGATAC
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCAIT CTGGAATTTA TCAGTATAGC
AGTGGGCTG GTCAGCATTC GAGGCGTGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA
GCGGGAGCTG TATCGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTCCGA
AGAAAACCTGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTAATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG
ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA
CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGCACCC GACAAAGTAC CTGAACGTGA
TAAGGATATT CTAAGCCAAA GT

〔ただし、Y4は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTTT CGG
TGTGCAG GATGCGGTAC CGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCCGTG
G ACAGCCCGGT TTGTTAAGT GACCACTTGG GTCAGTCCGA AGCA
GGGGGG CTCCCAAGGG GACCCGAGT CAGGAC またはその断片を示す〕ないし
その5'末端に開始コードATG を含有する塩基配列で示
されるポリヌクレオチドである請求項6記載のDNA

【請求項10】請求項6記載のDNAを含有するベク
ターで形質転換された形質転換体

【請求項11】請求項10記載の形質転換体を培地に培
養し、培養物中にグリア活性化因子を生成蓄積せしめ、
これを採取することを特徴とする該因子の製造法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はグリア細胞培養液よ
り得られ、グリア細胞、線維芽細胞等に対して増殖促進
作用を示す、新規なポリヌクレオチドであるグリア活性化因
子、該因子をコードするDNA、および該因子製造のため
の組換えDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】細胞成長因子は、多種のものが発見、研
究され、活用されてきている（細胞成長因子 part II、

日本組織培養学会編、1987、朝倉書店）。たとえば、上
皮細胞成長因子（EGF、Epidermal Growth Factor）、
血小板由来成長因子（PDGF、Platelet-Derived Growth Factor）や酸性あるいは塩基性線維芽細胞増
殖因子（aFGFもしくはbFGF、acidic or basic
Fibroblast Growth Factor）などである。これらは、
いずれも線維芽細胞株の増殖促進を指標として単離され
てきたものであり、その作用スペクトラムは広いが、特
異性に乏しい。近年、機能分化した細胞に特異的に作用
する増殖因子を探す努力が試みられつつあり、セラチノ
サイト成長因子（KGF、Keratinocyte Growth Factor）、
肝実質細胞成長因子（HGF、Hepatocyte Growth
Factor）等が単離され、その特異的な作用スペクトラム
から疾患への適用が期待されている。脳神経細胞は、生
後すぐに増殖を止め、以後、その数を減じて行く。近
年、老年での脳疾患、特に痴呆症が問題となつてきてい
るか、これは、原因不明、あるいは損傷等による脳神経
細胞の死滅によることが判つてきた。このような脳神経
細胞の死滅を防ぎ止めるためには、これらの細胞を賦活
化することが必要である。グリア細胞は脳内で神経細胞

のまわりをとり囲んでおり、脳神経細胞の生存を支持している。グリア細胞が放出しているであろう神経栄養因子の探索は、きわめて広く行われてきたが、まだ決定的な因子は見だされていない。グリア細胞は、その形態、および働きから、I型アストロサイト、II型アストロサイト、マクログランツ細胞等に分類されている。これらからグリア細胞を賦活化することは、それ自身では分裂増殖することのない脳神経細胞を賦活、維持することとなり、脳疾患改善に重要な方策となってきた。このため、脳神経細胞のみならず、グリア細胞に作用する増殖因子に渴望されてきた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】前記のように、グリア細胞に作用する増殖因子は、脳神経細胞の賦活化を目ざして、探索されており、PDGF、FGF等が、グリア細胞に対しても増殖促進作用を示すことが知られている。しかし、これらの因子は、他の細胞種に対する増殖促進作用も強く、思うようには医薬品として使用され得てはいない。グリア細胞に、より特異的に作用している因子を探し、これを医薬品として活用することは脳疾患の改善の方策として期待されていたが、現在まで、このような因子は得られていない。

【0004】

【課題を解決するための手段】一般的に、多くの細胞は自分自身の増殖を促す増殖促進因子を産生していることが知られるようになってきた。そこで本発明者らは、グリア細胞が産生する、グリア細胞に対する増殖促進因子について探索した。この結果、グリア細胞が該因子を産生していることを見出したが、ヒト・グリア細胞をヒトから採取することはできず、また、一般にそのままで維

持、培養できる細胞はない。そこで、グリア細胞としての形質を残しているグリオーマ細胞株を用いて検討を重ね、この因子（グリア活性化因子、GliaActivating Factor、以下GAFと略称することがある。）を単離、精製した。

【0005】一方、ヒトグリオーマ細胞より得られたGAFは極めて微量であり、医薬品として、あるいは研究材料として使用するため充分な量を得るには、大量のグリア細胞を培養するための時間と労力が必要とされる。そこで本発明者等は、さらにGAFをより簡便に得るために、GAFをコードするリヌクレオチドを同定し、該リヌクレオチドを用いて近年発展してきた組換えDNA技術を応用することにより、この問題を解決することも考えた。すなわち、本発明者らは、GAFのN末端側アミノ酸配列を解析し、この配列を基にオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。ヒトグリオーマ細胞NMCG1、あるいはヒト包皮由来初代培養細胞のmRNAより作製したcDNAライブラリーについて上記プライマーを用いて検索し、ヒトGAF cDNAをクローニングした。さらに、該cDNAを含む組換えDNAを構築し、該DNAで形質転換された形質転換体を培養すると、ヒトGAFが生産されることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づき、さらに研究した結果、本発明を完成した。

【0006】本発明は（1）グリオーマ細胞培養液より得られ、かつグリア細胞増殖促進活性を有する蛋白質であるグリア活性化因子、（2）グリオーマ細胞がヒトグリオーマ細胞である上記（1）記載のグリア活性化因子、

（3）アミノ酸配列：

Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp

で示されるポリペプチドを含むグリア活性化因子または 該因子作用を有するそのムテイン、

（4）アミノ酸配列：

(Met)-n-XI-Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg

Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp -X2

〔ただしX1は0または1を、X2はAla Pro Leu Gly Glu
Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro P
he Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val
Leu Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly G
ly Leu Pro Arg Gly Pro Ala Val Thr Asp またはその

断片を、X2はLys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile
Leu Ser Gln Ser またはその断片を、それぞれ示す〕で
示されるポリペプチドからなる上記(3)記載のグリア
活性化因子、

(5) アミノ酸配列:

(Met)n X3 Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

〔ただしX1は0または1を、X3はAla Pro または Le
u Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala V
al Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser

Pro Val Leu Leu またはその断片をそれぞれ示す〕で示
されるポリペプチドからなる上記(3)記載のグリア活
性化因子、

(6) アミノ酸配列:

X1' X2' Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

〔ただし、X1'はMet または Met Ala Pro を、X2'は
Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala
Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Se
r Pro Val Leu Leu またはその断片をそれぞれ示す〕で

示されるポリペプチドからなる上記(5)記載のグリア
活性化因子、(7)グリア活性化因子をコードするポリ
ヌクレオチドを含有するDNA、

(8) ポリヌクレオチドが塩基配列:

TTG GATCATTTAA AGGGGATTCT
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACCTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
TAICCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCAAT CTGGAATTTA TCAGTATAGC
AGTGGGCCCTG GTCAGCATTC GAGCGGTGGA CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA
GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA
AGAAAACCTGG TATAATACGT ACICGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG
ATACATGTT GCATTAAATA AAGATGGCAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA
CCGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GAC

で示されるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドである上記(7)記載のDNA、

(9) ポリヌクレオチドが塩基配列:

Y1-ITG GATCATTTAA AGGCGATICT
 CAGCGGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCAIT CTGGAATTTA TCAGTATAGC
 AGTGGGCTTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA
 GGGGGAGCTG TATCGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA
 AGAAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGCGG
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA
 CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCC CAC

〔ただし、Y1は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTT CGG
 TGTGCAG GATGCGGTAC CGTITGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCCGTG
 G ACAGCCCGGT TTTGTIAAGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA AGCA
 GGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGAGT CACCGAC またはその断

片を、Y2はAAAAGTAC CTGAAGTCTA TAAGGATATT CTAAGCCAAA
 GT またはその断片を、それぞれ示す〕ないしその5'
 末端に開始コドンATG を含有する塩基配列で示されるホ
 リヌクレオチドである上記(7)記載のDNA、

(10) ホリヌクレオチドの塩基配列:

Y3-AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA
 AGCAGGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGAGT CACGGACTTG GATCATTTAA AGGCGATICT
 CAGCGGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCAIT CTGGAATTTA TCAGTATAGC
 AGTGGGCTTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA
 GGGGGAGCTG TATCGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA
 AGAAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGCGG
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA
 CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCC CACAAAGTAC CTGAACGTGA
 TAAGGATATT CTAAGCCAAA GT

〔ただし、Y3は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTT CGG
 TGTGCAG GATGCGGTAC CGTITGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCCGTG
 G ACAGCCCGGT TTTGTIAAGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA AGCA
 GGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGAGT CACCGAC またはその断片を示す〕ないし

その5'末端に開始コドンATG を含有する塩基配列で示
 されるホリヌクレオチドである上記(7)記載のDNA、

(11) ホリヌクレオチドの塩基配列:

Y'-AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA
 AGCAGGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGAGT CACGGACTTG GATCATTTAA AGGCGATICT
 CAGCGGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCAIT CTGGAATTTA TCAGTATAGC
 AGTGGGCTTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA
 GGGGGAGCTG TATCGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA
 AGAAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGCGG
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA
 CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCC CACAAAGTAC CTGAACGTGA
 TAAGGATATT CTAAGCCAAA

〔ただし、Y'は AT GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTT
 CGGTGTCAG GATGCGGTACCGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCG
 GTGG ACAGCCCGGT TTTGTIAAGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA AGCA
 GGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGAGT CACCGAC またはその断片を示す〕で
 示されるホリヌクレオチドである上記(10)記載のDNA、(12)上記(7)記載のDNAを含有するベク
 ターで形質転換された形質転換体、(13)上記(1
 2)記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にグリ
 ア活性化因子を生成蓄積せしめ、これを採取することを
 特徴とする該因子の製造法に関するものである。

【0007】本発明のGAFは第一にヒト由来グリマ
 マ細胞株または上記(6)の形質転換体を培養して得ら
 れた培養液上清からグリマ細胞増殖活性を指標として単
 離された蛋白質からなり、かつグリマ細胞、線維芽細胞

に増殖促進活性を有するグリマ活性化因子を要旨とす
 る。更に本発明のGAFは、次の特徴を有する:

(a) ヘパリン親和性を有する(ヘパリンセファロース
 カラムより0.4~0.9M食塩濃度で溶出され
 る)。

(b) 分子量: SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動
 法で測定して、25000、29000、30000の
 三種の分子種がある。

(c) 活性の安定性: 100℃、5分の熱処理で活性を
 失い、またpH2、30分処理で部分的に活性を失う。

(d) 抗原性: 血小板由来成長因子(PDGF)、酸性
 線維芽細胞増殖因子(aFGF)、塩基性線維芽細胞増
 殖因子(bFGF)との間に免疫学的交差性を示した

い。

(e) 生物活性 クリア細胞、線維芽細胞、ラット副腎髓質褐色細胞腫由来PC-12細胞、に対して増殖促進活性を示す。

本発明のGAFは、分子量25000、29000、30000の三種の分子種があり、それぞれ分子種が一つの蛋白質であり、いずれも同等の生物活性を有していることが認められる。

【0008】本発明において、さらに以下由来のクリア細胞株または上記(6)の肝臓転換体を培養し、その培養上清よりGAF活性化因子を採取し、それを精製することを特徴とするGAFの製造法が提供される。本発明によるGAFを得るための該因子を含む細胞培養上清は、クリア細胞、例えばヒトグリセロール細胞NMC-G1の培養により得られる。クリア細胞の培養には静置培養、ローラボール培養、セカンドパストラーあるいは懸濁培養等のいかなる方法も用いられ得るが、好ましくはローラボール培養が用いられる。培地としては動物細胞用の培地、例えば、MEM培地、ライオンサイエンス(Science), 122, 501(1952)、DMEM培地(ウイロロジー(Virology), 8, 396(1959))、RPMI 1640培地[ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(Journal of the American Medical Association), 199, 519(1967)]、199培地(フレイ・ザンク・オブ・ザ・ソサエティ・フォー・バイオロジカル・サイエンス(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1(1950))などが挙げられ、好ましくは、DMEM培地が用いられる。培養にはこれにさらに約10~20%の胎児牛血清を添加しても良い。pHは約6~8であるのが好ましい。培養温度は30~40℃、好ましくは37℃で約24~100時間行い、必要に応じて培地交換を行う。

【0009】上記培養液よりGAF蛋白を分離精製するには、自体未知分離精製法を適切に組み合わせて行うことが出来る。これらの未知分離、精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動法などの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法などが挙げられる。さらに具体的に、上記培養液を遠心分離して夾雑沈殿物を除いた後、ヘパリンセファローゼクロマトグラフィーに付し、GAF蛋白を吸着、溶出することにより、効率よく該蛋白の濃縮、精製を行うことが出来る。

【0010】セファクルS-200等を担体としたゲルろ過もGAF蛋白の精製に有効である。例えば、ヘパリンセファローゼカラムで濃縮されたGAF蛋白を含む

溶出液を、さらに限外ろ過法などを用いて濃縮してセファクルS-200カラムを用いるクロマトグラフィーに付し、中性付近の緩衝液で溶出する。CMセルローゼ等の酸性樹脂のカラムクロマトグラフィーも有効である。たとえば、弱酸性緩衝液で平衡化したカラムを用いて、同じ緩衝液で透析した試料をクロマトグラフィーに付し、NaClなどの塩の直線濃度勾配溶出を行うことができる。また、ヘパリンセファローゼを担体としたアフィニティークロマトグラフィーは極めて有効である。例えば、中性付近のトリス塩酸あるいはピカリン酸などの緩衝液で平衡化したヘパリンセファローゼカラムを用いて、GAF蛋白を含む溶液をクロマトグラフィーに付し、十分洗った後、NaClなどの塩の直線濃度勾配溶出を行うことによりGAF蛋白を精製することが出来る。特に高速液体クロマトグラフィー用に関連されたピカリンカラム(例えばShodex AFpak HR-S94、昭和電気製など)は有効であり、前記ヘパリンセファローゼと同様に利用することが出来る。逆相高速液体クロマトグラフィーは、多くの蛋白の精製に威力を発揮しており、GAF蛋白もこの担体を用いて精製することが出来る。例えば試料を0.1%トリフルオロ酢酸を含む溶液としてカラムにかけ、0.1%トリフルオロ酢酸に添加したアセトニトリルの濃度勾配によって溶出を行うことができる。上記の操作を適宜、組み合わせることによりGAF蛋白を均一な標品として回収することが出来る。また、精製過程、あるいは保存過程での微量のチータージェントの共存は、標品の担体、あるいは容器壁の非特異的吸着を防ぐのに好適である。チータージェントとしてはCHAPS(3-[(3-(Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate]、NP-40、Iriton X100などが挙げられるが、特にCHAPSが好ましい。

【0011】培養上清中および精製過程でのGAF蛋白の活性は、例えばラット胎児(19日令)脳より分離採取した初代培養クリア細胞、あるいは未知BALB/c3T3細胞に対する³H-チミンのとりこみを指標とした増殖促進効果などにより測定することが出来る。得られた精製標品は透析、凍結乾燥を行い、乾燥粉末とすることも出来る。さらに血清アルブミンなどを添加して保存することも好適である。得られた精製標品を用いて、GAF蛋白の糖鎖構造を調べる事が出来る。この目的のためにはレクチンを用いたブローチングや糖鎖分解酵素などが使用され得る。得られた精製標品は、そのままN末端側アミノ酸配列を調べる事が出来る。また、蛋白分解酵素、たとえば、トリプシン、ジグムレン、トングスターゼ、V8プロテアーゼ等で分解処理したのち、生じたペプチド断片を逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて分離し、それぞれについて、アミノ酸配列を調べる事が出来る。アミノ酸配列の決定には自動アミノ酸配列分析計(例えばモデル470A、アプライド

ハイブリヂェムズ、米国)が特に有効に使用される。

【0012】得られたアミノ酸配列をもとに、対応する核酸塩基配列を求め、オリゴヌクレオチドを合成してGATF蛋白をコードしているcDNAのクローニングに用いることが出来る。

【0013】cDNAを得られれば、このcDNAを微生物、例えば大腸菌、枯草菌、酵母などにて発現させて、GATF蛋白をより容易に得ることが出来る。また、発現宿主としては動物培養細胞も用いられ、糖鎖構造が必要な場合には、きわめて好適な宿主として用いられることとなる。この様に遺伝子工学的手法を用いることにより、より容易にGATF蛋白の大量生産が可能となる。この様な遺伝子工学的手法によりGATFを得る場合、発現宿主の相違または突然変異等によりアミノ酸の欠損、置換等によりここに示すアミノ酸配列が異なることがあるが、このような蛋白であっても、GATF因子作用を有するものであれば、本発明のGATFに含まれる。また、動物細胞の培養上清から精製されたGATFに、N末端側アミノ酸配列が欠失した分子種が存在し、それらが同活性性を有していたことからみれば、GATFのアミノ酸配列の一部を欠失させる、あるいは他方配列を付加する、さらにはアミノ酸配列の一部を置換しても同等の活性を保持させることは可能である。遺伝子工学的手法を用いて、このような変異GATF蛋白をつくり、発酵等に対する安定性を高めること等も可能である。

【0014】本発明のヒトGATF活性化因子(1)のオリゴヌクレオチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する発現ベクターは、例えば(イ)ヒトGATF活性化因子(1)を培養上清より単離精製し、N末端側アミノ酸配列を分析する、(ロ)得られたアミノ酸配列を基に、それをコードするオリゴヌクレオチドブロッグを合成する、(ハ)ヒトGATF活性化因子をコードするRNAを細胞より抽出し、(ニ)該mRNAから単鎖の相補DNA(cDNA)を、次いで二重鎖DNAを合成し、(ホ)該相補DNAをファージまたはプラスミドに組み込み、(ヘ)得られた組み換えファージまたはプラスミドで宿主を形質転換し、(ト)得られた形質転換体を培養後、形質転換体から適当な方法、例えばDNAブローブを用いたハイブリダイゼーション法により目的とするDNAを含有するファージあるいはプラスミドを単離し、(チ)その組み換えDNAから目的とするクローン化DNAを切り出し、(リ)該クローン化DNAまたはその一部を発現ベクター中のプロモーターの下流に連結する、ことにより製造することが出来る。

【0015】ヒトGATFをコードするmRNAは、種々のGATF活性化因子産生細胞、例えばヒトT細胞、あるいはヒト線維芽細胞などから得る事が出来る。該ヒトT細胞としてはNMC-G1、またヒト線維芽細胞としてはWI-38(ATCC番号CCL-

75)などが挙げられる。上記細胞NMC-G1は平成2年10月31日から財団法人発酵研究所(IFO)に受託番号IFO 50281として、また平成3年2月21日から通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に受託番号FERM-BP-3294としてそれぞれ寄託されており、またWI-38はJ・アイ・カン・ライフ・カルチャー・コレクション(The American Type Culture Collection)発行のカタログ・オブ・セル・ラインズ・アンド・ハイブリドマーズ 第5版(Catalogue of Cell Lines & Hybridomas, 5th edition), 1985に掲載されている。

【0016】GATF産生細胞からRNAを調製する方法としては、ウエルシュ・チンガール・手法(Welsh-Chungwin)ら、バイオケミストリー(Biochemistry), 18, 5291(1979)などが挙げられる。このようにして得られたmRNAを母型とし、逆転写酵素を用いて、例えば岡田(Okayama)らの方法(モレキュラー・ト・セルラール・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology)2, 161(1982)および同誌 3, 280(1983)に従いcDNAを合成し、得られたcDNAをプラスミドに組み込む。cDNAを組み込むプラスミドとしては、例えば大腸菌由来のpBR322(シーン(Shen), 2, 95(1977)), pBR325(シーン, 1, 121(1978)), pUC12(シーン, 19, 259(1982)), pUC13(シーン, 19, 259(1982)), pUC118, pUC119、枯草菌由来のpUB110[バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochemical and Biophysical Research Communication), 112, 678(1983)]などが挙げられるが、その他のものであっても、宿主内で複製増殖されるものであれば、いづれをも用いることが出来る。

【0017】プラスミドに組み込む方法としては、例えば、マニアティス(J. Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) コーールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory), 第239頁(1982)に記載の方法などが挙げられる。またファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、例えばヒューン(Hyunh, T. V.)らの方法(ダイー・エヌ・エー・クローニング・アプローチ(DNA Cloning, A Practical Approach) 1, 49(1985))などが挙げられる。上記cDNAを組み込まれたプラスミドの例としては、ヒト正常2倍体細胞mRNAより合成したcDNAをベクター、例えばpCDベクター(Okayama)ら、モレキュラー・セル・バイオロジー(Molecular Cell Biology), 3, 280(1983)参照)を宿主(例えば、大腸菌x1776)に組み込んで作成してもよい。

【0018】このようにして得られたプラスミドは、適当な宿主たとえばエシェリキア(Escherichia) 属菌、バチルス(Bacillus) 属菌などに導入する。上記エシェリキア属菌の例としては、エシェリキア・コリ(Escheri-

chia coli) K12 DH1 (プロシーディング・オブ・サ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 60, 160 (1968)), M103 (ヌクレイック・アシッド・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309 (1981)), J.A221 (プロシーディング・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 1, 120, 517 (1978)), HB101 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41, 459 (1969)), C600 (エタライクス (E. coli) 39, 440 (1951)) などが挙げられる。上記バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチリス (Bacillus subtilis) M1114 (ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95, 87 (1984)) などが挙げられる。

【0019】プラスミドで宿主を形質転換する方法としては、たとえばマニティス・マニティス (C. Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning, コーリス・スクリプタ・パブリッシャー・ラバート・スプリング・ハーバー・ラボラトリー, 第2版 (1982)) に記載のカルシウムクロライド法あるいはカルシウムクロライドセリウムクロライド法などが挙げられる。このようにして得られた形質転換体中からGAFのアミノ酸配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして、自他公知の方法、たとえばコロニー・ハイブリダイゼーション法 (Gene, 10, 63 (1980)) およびDNA塩基配列決定法 (プロシーディング・オブ・サ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 74, 560 (1977)), (ヌクレイック・アシッド・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309 (1981)) を用い求めるクローンを選出する。このようにして、クローン化されたGAFをコードする塩基配列を含有するDNAを有するベクターを保持する微生物が得られる。

【0020】上記クローン化されたGAFをコードするcDNAを有するプラスミドは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化して使用することが出来る。クローン化されたcDNAから発現させない領域を切り出し、発現に適したビークル (ベクター) 中のプロモーターの下流に連結して発現型ベクターを得ることができる。ベクターとしては、上記の大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), 枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTF5, pC19.4), 酵母由来のプラスミド

(例、pSH19, pSH15), あるいはエファージなどのバクテリオファージおよびレトロウイルス、ワクシニアウイルスなどを動物ウイルスなどが挙げられる。

【0021】該cDNAはその5'末端に翻訳開始コードを有するATGを有し、また3'末端には翻訳終止コードを有するTAA, TGAまたはTAGを有して、よい。これらの翻訳開始コードと翻訳終止コードは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することでも

きる。さらに該DNAを発現させるにはその上流にプロモーターを接合する。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する際の宿主がエシェリキア属菌である場合は、T7プロモーター, lacプロモーター, lacZプロモーター, trpプロモーター, lacAプロモーター, recAプロモーター, SPFLプロモーター, lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター, SPO2プロモーター, penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター, PGKプロモーター, GAPプロモーター, ADHプロモーターなどが好ましい。とりわけ宿主がエシェリキア属菌でプロモーターがT7プロモーターまたはlppプロモーターであることが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター, レトロウイルスのプロモーターなどが挙げられ、とりわけSV40由来のプロモーターが好ましい。

【0022】このようにして構築されたGAFをコードするcDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。宿主としては、たとえばエシェリキア属菌、バチルス属菌、酵母、動物細胞などが挙げられる。上記エシェリキア属菌、バチルス属菌の具体例としては、前記したものと同様のものが挙げられる。上記酵母としては、たとえばサッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22R⁺, NA87-11A, DKD-5Dなどが挙げられる。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, マウスL細胞, ヒトFL細胞などが挙げられる。

【0023】上記エシェリキア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディング・オブ・サ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110 (1972) やジャーナル・オブ・バイオロジー, 17, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なわれる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディング・オブ・サ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 75, 1929 (1978) に記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばウイルス学 (Virology), 52, 456 (1973) に記載の方法に従って行なわれる。

【0024】このようにして、GAFをコードするcDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。その一例としては、たとえば後述の実施例5で得られた *Escherichia coli* DH1-1-pGAF1が挙げられ、該微生物は、平成3年8月28日に財団法人発酵研究所 (IFO) に受託番号IFO

の一因となっていることも考えられる。従って、脳腫瘍ではGAEの産生の促進されていると考えられるので、GAEおよびその抗体さらにはGAE-cDNAは腫瘍の診断にも有用となる。またグリア細胞の培養研究には、有効な因子として活用される。

【0030】本発明のGAEを医薬として用いるには、そのまま粉末として、または他り薬理的に許容される担体、賦形剤、希釈剤とともに医薬組成物（例えば、注射剤、錠剤、カプセル剤、散剤、軟膏など）として、温血哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、犬、ネコ）に対して経口のまたは経口的に安全に投与することによって、その作用の製剤化にたとえば生理食塩水またはブドウ糖やその他の補助薬を含む水溶液を用い、常法に従って行なわれる。錠剤、カプセル剤等医薬組成物も常法に従って調製しうる。さらに、医薬組成物としての注射剤、散剤、錠剤、カプセル剤等を製造する際には、無菌条件下で行なう。本発明のGAEを上記の医薬として用いる場合には、たとえば上記した温血動物に、投与ルート、症例などを考慮して、1回約0.5mgないし50 μ g/kg、1日量約1mgないし100 μ g/kgの中から適当量を選んで投与される。また、本発明のGAEを細胞培養を促進させるための試薬として用いる場合、培地1リットルあたり約0.01~10 μ gの範囲に好ましくは約0.1~10 μ gとなるように培地に加えることが好ましい。

【0031】本発明明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を上記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL-体を示すものとする。

【0032】DNA：デオキシリボ核酸

cDNA：相補的デオキシリボ核酸

A：アデニン

T：チミン

G：グアニン

C：シトシン

RNA：リボ核酸

mRNA：メッセンジャーリボ核酸

dATP：デオキシアデニン三リン酸

dTTP：デオキシチミン三リン酸

dGTP：デオキシグアニン三リン酸

dCTP：デオキシシトシン三リン酸

ATP：アデニン三リン酸

EDTA：エチレンジアミン四酢酸

SDS：ナトリウム硫酸サリウム

GlyまたはG：グリシン

AlaまたはA：アラニン

ValまたはV：バリン

LeuまたはL：ロイシン

IleまたはI：イソロイシン

SerまたはS：セリン

ThrまたはT：スレオニン

CysまたはC：システイン

MetまたはM：メチオニン

GluまたはE：グルタミン酸

AspまたはD：アスパラギン酸

LysまたはK：リジン

ArgまたはR：アルギニン

HisまたはH：ヒスチジン

PheまたはF：フェニルアラニン

TyrまたはY：チロシン

TrpまたはW：トリプトファン

ProまたはP：プロリン

AsnまたはN：アスパラギン

GlnまたはQ：グルタミン

【0033】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【例1】グリア細胞に対する増殖促進活性の測定

ラット胎児脳より調製したクリア初代培養細胞を非働化したウシ胎児血清を10%含むDMEM培地に3×10⁴個/mlとなるように希薄させた。その細胞希薄液100 μ lを96穴の平底マイクロプレート（A-N Nine社製、Roskilde、デンマーク）の各ウェルに入れ2~3日間培養後、各ウェルより75 μ lの培地を廃棄し、各ウェルに血清を含まないDMEM培地175 μ lを添加した。さらに2~3日間培養した後、各ウェルより20 μ lの培地を廃棄した。その後非働化したウシ胎児血清を1、2、5%含むDMEM培地で適当に希釈したテストサンプルの20 μ lを各ウェルに添加後、一晚培養した。翌朝、各ウェルに1 μ Ciのトリチウムチミン（5Ci/mmol、1mCi/ml、RCC-Amersham）を添加後、さらに5~7時間培養した。培養後、各ウェルの培地を廃棄後、各ウェルに100 μ lの0.5%トリチンと0.01%EDTAを含むPBSを添加し、数分間室温にて放置した。顕微鏡でクリア細胞が浮遊していることを確認した後、浮遊細胞をタイターテクセルハーベスター（Flow Laboratories社製、Virginia, U.S.A.）を用いてガラスファイバーフィルター（大日本製薬株式会社製）上に集め水で洗浄後、細胞に取り込まれたトリチウムチミンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0034】実施例1

①クリアーマ細胞NMC-G1の培養上清の採取
ヒトグリアーマ細胞NMC-G1を、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地中でコーニンググローラーボトルを用い回転させながら37℃で培養した（0、2回/分）。コーニンググローラーボトルの表面上にNMC-G1

細胞がコンフルエントの状態になった後、培地を0.5%の胎児血清を含むDMEM培地に変更した。3~4日後に細胞培養上清を採取し、培地を新しい0.5%の胎児血清を含むDMEM培地に変更した。採取した細胞培養上清を遠心(1500g)で沈沈、セラルJ-6B、4000回転(分、15分間)、遠心上清を得、精製の出を材料とした。

【0035】2GAFの精製

ステップ1: スパイクアミノエチルカラムクロマトグラフィー
前に記した方法で得たNMC-G1細胞培養上清180μlに5M NaCl水溶液を1.50容量(360μl)、10%グリセリンを1.1000容量(180μl)添加した。このように調製したNMC-G1細胞培養上清を、60から0.2M NaClを含む20mM リス塩酸緩衝液(pH7.6)で平衡化したヘキサセファローズ(登録商標)C1-6Bカラム(カラム容積は80ml, Pharmacia LKB Biotechnology社製, Uppsala, Sweden)にヘキサセファローズを用いて通す(流速1.50ml/時間、4°C)。上清を4.50mlの0.2M NaClを含む20mM リス塩酸緩衝液(pH7.6)で洗浄した後(流速1.50ml/時間、4°C)、吸着したたんぱく質を400mlの2M NaClを含む20mM リス塩酸緩衝液(pH7.6)で溶出した(60ml/時間、8ml/フラクション、4°C)(図1)。溶出した各フラクションについてグリセリンに対する増殖促進活性を参考例1に記載の方法で測定し、活性を示した画分(フラクション11からフラクション23)を集めた。

【0036】ステップ2: 濃縮

合計32μlの培養上清についてステップ1のヘキサセファローズカラムクロマトグラフィー(ステップ1)を行ない活性画分をブールした(192μl)。この溶液をDiallow YM-10メンブラン(分画分子量: 10,000, Amicon Corp社製, Massachusetts, U.S.A.)で窒素ガス加圧下約3.5mlにまで濃縮した(4°C)。

【0037】

ステップ3: セルろ過カラムクロマトグラフィー
ステップ2で濃縮した溶液約3.5mlをセファクリルS-200HR(カラム容積は178.7ml、内径5cm、長さ91cm, Pharmacia LKB Biotechnology)にのせ、0.5M NaClと0.1%CHAPSを含む20mM リス塩酸緩衝液で溶出・分画した(8.5ml/時間、10ml/フラクション、4°C)(図2)。各分画についてグリセリンに対する増殖促進活性を参考例1に記載の方法で測定し、活性を示した画分(フラクション10.5からフラクション11.7)をブールした。さらに55リットルのNMC-G1培養上清について、ステップ1、2、3の各ステップを2回に分けて行なった。

【0038】ステップ4: スパイクアミノエチルカラム

クロマトグラフィー

3回のセルろ過カラムクロマトグラフィーでの活性画分をブールした(390μl)。この溶液を9.9mlの100%グリセリン、2.61mlの10%CHAPS水溶液、5.22mlの1M リス塩酸緩衝液(pH7.6)と15.4mlの水を添加した(合計65.1ml)。これを用いて0.3M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mM リス塩酸緩衝液(pH7.6)で平衡化したヘキサセファローズ(登録商標)C1-6Bカラム(カラム容積は5.8ml)に通した(2.5ml/時間、4°C)。カラムを80mlの0.3M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mM リス塩酸緩衝液(pH7.6)で洗浄した後(2.5ml/時間、4°C)、吸着したたんぱく質をNaClの濃度を直線的に上昇させることにより溶出し、分画した。塩濃度勾配は0.3M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mM リス塩酸緩衝液(pH7.6)50ml、1.2M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mM リス塩酸緩衝液(pH7.6)50mlを加えていくことにより作製した(2.5ml/時間、2ml/フラクション、4°C)(図3)。

【0039】ステップ5: スパイクアミノエチル高速液体カラムクロマトグラフィー

ステップ4でのグリセリンに対して増殖促進作用を示す活性画分(フラクションNo. 23-30)をブールした16mlに、3.2mlの0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mM リス塩酸緩衝液(pH7.6)を添加した。この4.8mlの溶液のうち4.6mlを、HR-894カラム(径8mm、長さ50mm、昭和電工、日本)を装置した高速液体クロマトグラフィー(Varian model 5040 system, Varian Associates社製, California, U.S.A.)にかけた。シリカに吸着したたんぱく質は、NaClの濃度を直線的に上昇させることにより、流速1ml/分で溶出し、分画(1ml/フラクション)した。用いた緩衝液はAが0.2M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mM リス塩酸緩衝液(pH7.6)で、Bが2M NaCl、0.1%CHAPSと15%グリセリンを含む20mM リス塩酸緩衝液(pH7.6)であらう。溶出のプログラムは次に記すとおこなった。すなわち0分(100%A)→10分(90%A+10%B)→15分(90%A+10%B)→50分(65%A+35%B)→60分(100%B)→64分(100%B)→65分(100%A)として行なった(図4)。カラム温度は室温であった。

【0040】

ステップ6: 逆相高速液体カラムクロマトグラフィー
ステップ5で得られた活性画分(フラクションNo. 32-38)をブールした7mlに、1.75mlの0.5M

リン酸緩衝液 (pH 6.0) を添加した。この 8.75 ml の溶液のうち 8 ml を、Vydac C4 カラム (径 0.46 cm × 長 25 cm, Vydac, California, U. S. A.) を装置した高速液体クロマトグラフ (Varian model 5040 System) にかけた。吸着したたんぱく質はアセトニトリルの濃度を直線的に上昇させることにより流速 0.8 ml/分 で溶出・分画 (0.8 ml/分 (フラクション) した。用いた溶媒は A が 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) + 9.9% 水、B が 0.1% TFA + 9.0% アセトニトリルとした。溶出のプログラムは次に記すとおりで行なった。すなわち 0 分 (100%A) → 15 分 (65%A + 35%B) → 110 分 (50%A + 50%B) → 112 分 (100%B) → 117 分 (100%B) → 120 分 (100%A) として行なった (図 5)。カラム温度は室温であった。分取後、スピードバ

ックコンセントレーター (モデル A290, サーバント社製、米国) でアセトニトリルを除去した後、蒸留水を添加してすべての画分を 0.5 ml の液量に調整した。活性画分 (フラクション 55, 59, 60, 61, 62) を 2-メルカプトエタノール存在下 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、銀染色した結果を図 6 に示す。各画分は各々 25 kDa (フラクション 55), 29 kDa (フラクション 59, 60), 30 kDa (フラクション 61, 62) の単一なバンドをなした。

【0041】⑤ 精製の要約

NMC-G1 培養上清 33 リットルを用いての精製の要約を表 1 に記す。

【0042】

【表 1】

サンプル	全たんぱく量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/μg)	活性回収率 (%)	精製倍数
ヘパリン 2 モル 食塩溶出液	221	177×10^5	8.0×10^2	100	1
濃縮 (YN-10)	217	216×10^3	1.0×10^3	122	1.3
セファクリル S-200HR	17.3	126×10^3	7.3×10^3	71	9.1
ヘパリンカラム (2 回目) 2.12		60.6×10^3	2.9×10^4	34	38
ヘパリン HPLC	0.453	34.5×10^3	7.6×10^4	20	95
逆相 EPLC 分子量 25,000	0.0003 *	1.84×10^3	6.1×10^6	1.1	7,600
分子量 29,000	0.0002 *	1.26×10^3	6.3×10^6	0.7	7,900
分子量 30,000	0.001 *	4.85×10^3	4.4×10^6	2.8	5,500

【0043】生物活性の測定は、参考例 1 に記載した方法で行なった。生物活性の単位はトリチウムチミジンの 50% 取り込み値を示すサンプルの希釈率の逆数とした。なお、トリチウムチミジンの 100% 取り込み値は、10% ワシ胎児血清により誘導される値とした。蛋白質量は 280 nm における吸光度 1.0 が 1 mg/ml の蛋白濃度であるとして換算した。*印の蛋白質量は銀染色による標準蛋白の染色強度を基に決定した。

【0044】

実施例 2 GAF の各種培養細胞に対する作用 (1)

① グリア細胞に対する増殖促進活性

実施例 1-② に記載した方法で得られた精製本因子は、グリア細胞に対し増殖促進活性を有している (図 7)。図中横軸は GAF 濃度を示す。なおグリア細胞に対する

増殖促進活性の測定方法については、参考例 1 に記載した方法に従って行なった。精製の最終ステップである逆相高速液体カラムクロマトグラフおよびアセトニトリルを除去する操作をした直後の精製標品について、再度グリア細胞に対する増殖促進活性を測定した。その結果を図 8 に示す。図中横軸は GAF 濃度を示す。図 7 と図 8 の結果において、50% トリチウムチミジン取り込み値を与える GAF 濃度に差が生じたりは、以下の理由によると考えられる。すなわち、図 7 は精製後 -80°C で保存後、標品を用いた時の結果であり、低蛋白濃度溶液の凍結融解操作により GAF 蛋白が変性失活または容器へ吸着したものと推測される。

【0045】(2) グリア細胞増殖促進活性②

GAF を添加した後のグリア細胞数の変化を調べた。以

下に記載した方法に従って行った。非働化したウシ胎児血清を1.0%含むDMEM培地に3×10⁴個/cm²となるように浮遊させ、その500μlを24本の培養プレート(Linbro社製、米国)の各ウェルに入れ、3日間培養した。その後各ウェルより440μlの培地を廃棄し、新たに340μlのDMEMを添加した。次に実施例1-2(表1)に記載したペーパースプレッドプレート法で得られたGAF活性画分を、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で50倍に希釈した溶液を50μl、またペーパースプレッドプレート法で得られたGAF活性画分を50μlを添加したウェル、どちらか片方のみを添加したウェル、また対照群として両方を添加しないウェルを作った。全てのウェルは、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で最終容積が500μlとなるようにした後、さらに2日間培養した。培養後、各ウェルを3mlのDMEMで2度洗浄し、0.5mlの0.2%トリプシンと0.01%EDTAを含むPBSを添加し細胞を浮遊させ、各ウェルの細胞数をコールター細胞数計測機(コールター社、ZM型)を用いて算出した。結果を図9に示す。GAF細胞数はGAFを添加することにより無添加群に比べ1.6倍に増加した。しかしペーパースプレッドプレート法による効果はなかった。

【0046】(3) マウス細胞増殖促進活性の経時変化
GAF-マウス細胞増殖促進活性の経時変化を、以下に記載すること以外は参考例1に記載した方法に従って調べた。すなわち、実施例1-2(表1)に記載したペーパースプレッドプレート法で得られたGAF活性画分を、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で800倍に希釈したサンプル20μlをウェルに添加後、4、8、13、16、19、22、25、28、31および40時間後には、各ウェルにそれぞれ1μCiのトリチウムチミンを添加した。3時間後にハーベストし、細胞に取り込まれたトリチウムチミンの量を液体シンチレーションカウンタにて測定した。結果を図10に示す。GAF添加後16から19時間後にトリチウムチミンの取り込みがピークになった。

【0047】(4) 線維芽細胞に対する増殖促進活性
実施例1-2に記載した方法で得られた精製因子は、線維芽細胞マウスBALB/3T3 clone A31細胞に対し増殖促進活性を有していた(図11)。図中横軸はGAF濃度を示す。なお線維芽細胞A31に対する増殖促進活性の測定については、以下に記載する方法で行なった。マウスBALB/3T3 clone A31細胞を5%仔牛血清を含むDMEM培地でマウス96穴マイクロタイタープレート(牛込)に1穴あたり2×10³個を75μlの培地にて播種して、培養し、翌日、各ウェルより50μlの培地を廃棄し、各ウェルに血清を含まないDMEM培地を175μl添加した。3〜4日間

培養した。各ウェルより20μlの培地を廃棄した。その後、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で適当に希釈したサンプル20μlを各ウェルに添加して培養した。翌朝、各ウェルに1μCiのトリチウムチミン(5Ci/mmol, 1mCi/ml, R.C.C. (Amersham))を添加後、さらに5〜7日間培養した。培養後各ウェルを約1mlのPBSで洗浄し、100μlの5% SDS水溶液を添加し、37℃で一晩放置した。各ウェルの細胞抽出液をチューブに集め、細胞に取り込まれた³H-TdR量をシンチレーションカウンタにて測定した。さらに、精製の最終ステップである逆相高速液体カラムクロマトグラフィーおよびアフィニティ操作をした直後の精製品について、5Ci/mmol, 1mCi/mlのトリチウムチミン溶液を用いて再度線維芽細胞A31に対する増殖促進活性を測定した。その結果を図12に示す。図中横軸はGAF濃度を示す。図11と図12の結果において、50%トリチウムチミンの取り込み値を与えるGAF濃度に差が生じたのは、以下の理由によると考えられる。すなわち、図11は精製後(80℃で保存後の標品を用いた)の結果であり、低蛋白濃度溶液の凍結融解操作によりGAF蛋白が変性失活または容器へ吸着したものと推測される。

【0048】

(5) ヒトさい帯血管内皮細胞に対する作用

実施例1-2に記載した方法で得られた精製因子は、ヒトさい帯血管内皮細胞に対し増殖促進活性を有していなかった(図13)。図中横軸はGAFまたはbFGFのたん白濃度を示す。なおヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性は以下に記載する方法に従って行なった。本測定に用いられた細胞は、ヒトさい帯より単離された静脈血管内皮細胞(HUVEEC細胞)である。また、細胞増殖度の測定には以下に述べるMTTアッセイ法を用いた。MTTアッセイの手法は多田らの方法(ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド(J. Immunol. Methods), 93, 157 (1980))に若干の変更を加えた。即ち、祖代維持されているHUVEEC細胞を0.002% EDTA (ドーライ社345-01882)を含む0.125%トランスフェレン酵素溶液(ペーパースプレッドプレート社)を用いて単一細胞に解離し、得られた細胞を生胎児血清(ワイタカーバイオテクノロジー社)を2.5%含む、G1T培地(日本製薬398-00515)からなるHUVEEC細胞培地に懸濁した。この細胞懸濁液に含まれる細胞数をコールター細胞数計測機(コールター社、ZM型)を用いて算出し、1mlの培養に供した。2×10³個のHUVEEC細胞を含む100μlのHUVEEC細胞懸濁液を、96穴培養皿(マシク社、F96)に加え、37℃で培養した(日立炭酸ガス・酸素ガス制御培養機CH-16型、CO₂:5%、O₂:7%)。培養翌日には、各々のサンプルをHUVEEC細胞培地に加えた。さらにペーパースプレッドプレート法を終濃度5.0μg/mlないし2.0μg/mlに

なるように添加したものである。各サンプルを加えたのち、さらに培養を3日間行ない、培養皿より培地を除去し、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ のMTT試薬（バータース社、34105820）を含むHUVET培地を $100 \mu\text{l}$ 加し、 37°C で4時間保温した。その後、 1.0% SDS水溶液（和光純薬、99-07145）を $100 \mu\text{l}$ 加え、4時間保温を続け、反応終了の後、反応液を含む96穴培養皿を振盪し、反応液が波長 590 nm において吸収を、マイクロタイタープレート吸光度測定機（マイクロテック、MCC-341）を用いて測定した。

【0049】（6）ラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞系に対する作用

実施例1-⑤に記載した方法で得られた精製因子は、ラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞系に対する増殖促進活性を有していた（図14）。図中横軸はGAF濃度を示す。なおPC-12に対する増殖促進活性の測定は以下に記載する方法で行なった。GAFを非飽和したマヌ血清を 1% 含むRPMI-1640培地で適量に希釈し、その $50 \mu\text{l}$ を96穴マイクロプレートに入れ、次にPC-12細胞を非飽和したマヌ血清を 1% 含むRPMI-1640培地に 1.0×10^5 個 $\cdot \text{ml}^{-1}$ になるように希釈させ、その細胞希釈液 $50 \mu\text{l}$ を96穴の平底マイクロプレート（A. N. Nunc社製、Roskilde、デンマーク）の各ウェルに入れ、さらに2日間培養した。培養後、各ウェルに、 $5 \mu\text{Ci}$ のトリチウムチロシン（ $5 \text{ Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$, $1 \text{ mCi} \cdot \text{ml}^{-1}$, RCCA, Amersham）を添加後、さらに5時間培養した。培養後細胞をTitertekウェルパーセプターを用いてガラスファイバースクリーン上に集め水で洗浄後、細胞に取り込まれたH-チロシンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0050】（7）活性の安定性

ペーパセファロース（登録商標）CL-6Bカ 2 M NaCl 溶出画分（実施例1⑤ステップ1）を、 100°C で5分熱処理すると活性は完全になくなった。また室温で $\text{pH} 2$ 、30分処理すると部分的に活性を失った（図15）。図中横軸はGAFの希釈倍数を示している。

（8）抗原性：酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）とクアア活性化因子間の免疫学的交差性

実施例1-⑤に記載の方法により精製した標品について、抗aFGFウサギポリクローナル抗血清と抗bFGFウサギIgGを用いてウエスタンブロッティングを行なった（図16）。図16から判るように本因子はaFGFとbFGFそれぞれとの間に免疫学的交差性を示さなかった。

【0051】実施例3

NMC-G1細胞が産生するGAF蛋白成分の性質

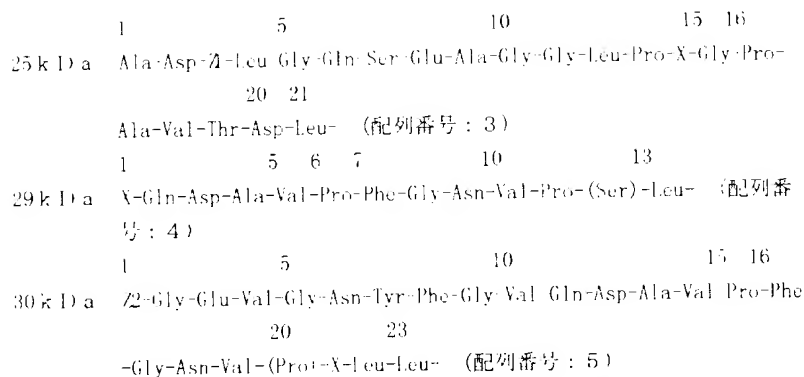
実施例1で得られた 25 kDa GAF、 30 u g 、 29

kDa GAF、 30 u g および 30 kDa GAF、 60 u g をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、ProBlott（登録商標）（Applied Biosystem社製、カリフォルニア、米国）上に乾式ブロッティング装置（AETT社製、東京）を用いて蛋白をトランスブレイク（メンブレン）を 2% PVP-360溶液（ 2% ポリビニルピロリドン-360）（シグマ社製、米国）を含む 1% 酸緩衝液-食塩（ 8 g NaCl 、 0.2 g KCl 、 $1.15 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.2 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ を 1 l の水に溶かし $\text{pH} 7.4$ としたもの）に45分間振とうしつつ浸した後、メンブレンをギブコ（化研）ウサリシA（Vector Lab社製、米国）を $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ の濃度で含む 2% PVP-360溶液に移し、1時間振とうした。その後メンブレンをTNT緩衝液（ 0.5 M NaCl と 0.1% Triton X-100を含む 2.5 mM トリス塩緩衝液（ $\text{pH} 7.5$ ））で洗浄した（10分間、3回）。さらに、メンブレンをブロッティングとギブコ（化研）ウサリシA（登録商標）標準複合物（Standard Vectastain（登録商標）ABCキート、Vector Lab社製）を含むリン酸緩衝液-食塩溶液に45分間振とうしつつ浸した後、TNT緩衝液で洗浄した（10分間、3回）。 12 mg 4-クロロ-1-ナフトールと 4 ml スクワールを混せたものに 20 ml TNT緩衝液（ 0.5 M NaCl を含む 2.5 mM トリス塩緩衝液（ $\text{pH} 7.5$ ））と $13.2 \mu\text{l}$ 過酸化水素水を混せたものに加え、それにメンブレンを浸し、発色させた。図147にその結果を示す。N-グリコシル化を用いる酵素的脱グリコシル化は、Genzyme社（ボストン、米国）のプロトコールに従って実施した。GAFをN-グリコシル化処理した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ゲルを銀染色した結果を図18に示す。 25 kDa 、 29 kDa および 30 kDa のGAFは部分的ではあるが、各々その分子量が3から4 kDaに減少した。以上、3つの実験より、 25 kDa 、 29 kDa および 30 kDa GAFにN-グリコシル型糖鎖が付加していることが確認された。

【0052】実施例4

N末端アミノ酸配列の分析

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（還元条件）で単一の3種類のGAF（ 25 kDa 、 29 kDa および 30 kDa ）を、ポリヒモリジンダイアルサイドマイクロメンブレンであるProBlott（登録商標）（Applied Biosystems社製、カリフォルニア、米国）に吸着させ、ブロッティングキューション（登録商標）473Aシステム（Applied Biosystems社製）を用いて、アミノ酸配列の解析を行なった。用いた蛋白量は、 25 kDa GAFが 60 pmol 、 29 kDa GAFが 5 pmol 、 30 kDa GAFが 5.5 pmol であった。得られた配列の結果を以下に記す。



Z1=HisまたはProを示す。

Z2=LeuまたはAlaを示す。

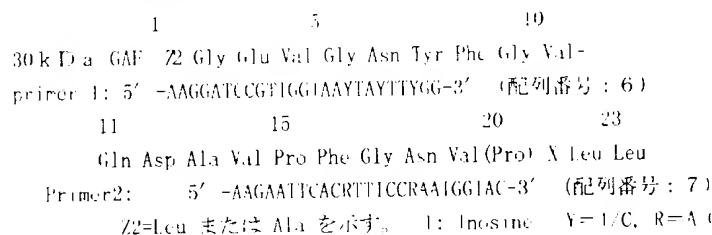
X:未同定のアミノ酸

(): 確定できなかったが推定されたアミノ酸

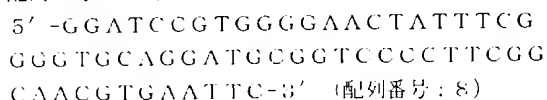
最初のフラップのアミノ酸 (N末端アミノ酸) および10番目を超えるアミノ酸については確実性に乏しい。

【0053】実施例5

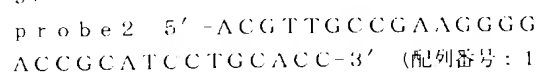
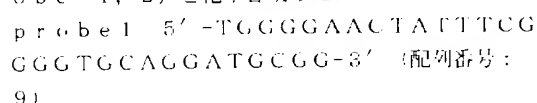
GAF cDNAのクローニングとその塩基配列を解析
実施例3で得られた30 kDa GAFのアミノ酸配列をもとに、この配列に対応し、かつ制限酵素の認識配列を付加した上記のオリゴヌクレオチドプライマー2本 (primer 1, 2) を合成した。



このプライマーを用いてヒトゲノム由来DNAをテンプレートとしてPCR (polymerase chain reaction) 反応 (Mullis, K. B. & Faloona, F. A. メソサップ・イン・エンジニアリング (Academic press) 155巻, 335頁, 1987) を行った。(GeneAmp (登録商標) DNA Amplification Reagent Kit (シエタス社, 米国) ケノムDNA 1 μ gに対して、プライマー1, 2をそれぞれ560ng加え、100 μ lの反応液中Ampli Taq (登録商標) (シエタス社, 米国) 2.5ユニットを添加して94°C1分、50°C2分、72°C3分のDNA合成サイクルを25回繰り返した。この反応物について、アクリルアミドゲル電気泳動を行い予期される長さ (63bp) の断片を回収し、その塩基配列を解析したところ、下記の配列が得られた。



この配列をもとにして再度、下記のプローブ2本 (probe 1, 2) を化学合成した。



(1)

一方ヒト包皮由来初代培養細胞mRNAより合成したcDNAをpCDベクター (Okayamaら, モレキュラー・セル・バイオロジー (Molecular Cell Biology), 3, 280 (1983) 参照) に組み込んで作成した大腸菌x1776を宿主としたcDNAライブラリーをNational Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, U. S. A. の岡田博士より分与を受けた。このcDNAライブラリーよりアルカリ法 (Birnboim, H. C. & Doly, J. スクレンジック・アナリシス・リサーチ (Nucleic Acids Research), 1, 1513 (1979)) でプラスミドDNAを抽出し、このDNAを大腸菌DH1に感染させ、約 2×10^5 個のcloneよりなる大腸菌DH1を宿主としたcDNAライブラリーを作成した。

【0054】上記大腸菌DH1を用いたcDNAライブラリーをニトロセルロースフィルター (ミリポア社, HATFフィルター) 上に約 1×10^5 clone/フィルターとなるように10枚まき、このフィルターをバスカーフィルターをしている各2枚ずつを1組としたレプリアフィルター計20枚を作成した。このレプリアフィルター上の大腸菌を0.5N NaOH溶液で溶かし、露出変性したプラスミドDNAをフィルター上に固定した [Crundstein, M. & Hogness,

D. S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 8961 (1975)]

【0055】前記化学合成したprobe 1, 2についてT4ポリヌクレオチルキナーゼと γ - ^{32}P -ATPとにより、5'末端に ^{32}P を導入し、これらをプローブとして別々にDNAを固定したソリッドサポートに結合させた。結合反応は、 $10\mu\text{Ci}$ のプローブを含む $5\times\text{SSPE}$ [180mM NaCl , $10\text{mM NaH}_2\text{PO}_4$, 1mM EDTA (pH7.4)], $5\times\text{Denhardt's}$, 0.1% SDS, $100\mu\text{g}$ 阻変性ヤケ種子DNA溶液 10ml 中で、 55°C 16時間行い、反応後ソリッドをサポートを $5\times\text{SSC}$ [0.15M NaCl , $0.015\text{M Sodium citrate}$ 0.1% SDS溶液で室温で3回さらし、 60°C 30分ずつ2回洗浄した(T. Maniatis等, "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Laboratory, P. 309 (1982))。

【0056】洗浄したサポートよりラジオマーキングをとり、二種類のプローブの両方に対して反応する菌株を二株検出し、ソリッドサポートよりラジオマーキングを重ね合わせるにより探した。この方法により 1×10^6 コロニーより二種類の菌株に対して反応する二株を得た。これら二株よりプラスミドDNAをアルコール法(前出)によって抽出精製した。プラスミドDNA中のcDNA部分を制限酵素BamHIにより切り出し、アコースティック電気泳動で分離すると、二株由来のcDNAはいずれも約1.55Kbの同鎖長を示した。従って、この二株は同じものであると考えられた。この二株の一方の菌株(Escherichia coli DH-1-pGAF1)に含まれるプラスミド中のcDNA部分の塩基配列を部分キシマクレチド合成阻止法(J. Messing等, スクレンジック・アミーズ・リサーチ, 9, 309 (1981))によって決定した。その塩基配列(配列番号:2)および塩基配列から推定されるアミノ酸配列(配列番号:1)を図19に示した。pGAF1に含まれるcDNA部分は1493bpであり、5'側非翻訳領域、全アミノ酸コード領域、3'側非翻訳領域及びpolyA鎖を含んでいた。コードされていたアミノ酸配列は208アミノ酸であり、この配列中にN末端配列分析(実施例4)により明らかにされた30kDa、29kDa、25kDaの部分アミノ酸配列はすべて含まれていた。一部(25kDaの1位のAla、29kDaの12位のSer、30kDaの23位のLeu)、蛋白質のアミノ酸分析(実施例4)で得られた配列と相異するアミノ酸配列がコードされているが、相異点はいずれもアミノ酸配列分析で不確実な結果を与えやすいN末端、あるいは10残基を超えて固定された部分であり、cDNAより推定された配列の方が正しいものと考えられる。

【0057】実施例6 GAFをコードする遺伝子の動物細胞における発現

(1) GAFがCOS-7細胞での発現

COS-7細胞を10%NU-Serum (Collaborative Research社)を含むIMDM培地でフラスコ(径60mm)フラスコ・クォンティシェムに1枚当り 6×10^5 個播種した。翌日血清フリーIMDM培地で洗浄後、公知の方法(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 52:3365 (1987))に従い、プラスミドpGAF1のDNA $2\mu\text{g}$ 及び $10\mu\text{g}$ と $400\mu\text{g/ml}$ のDIAF-dextranとを含む反応液を調製し細胞に添加した。37°Cで4時間インキュベーションした後2分間DMSO処理を行った。その後10%NU-Serumを含む培地(3ml/ディッシュ)で培養を続け、70~72時間後に産生されたGAFを含む培地を集めた。さらにディッシュあたり1.5ml/ディッシュの生理食液中に細胞を回収し、pGAF1をトランスフェクトしたCOS-7細胞の培養上清中にGAF細胞増殖促進活性が検出された。GAF-cDNAが含まれていないプラスミドはプラスミドpCDXをトランスフェクトしたCOS-7細胞、またトランスフェクトしない細胞の培養上清中には活性は検出されなかった(420)。凍結融解を2度および超音波処理をして得られた細胞抽出液中にはコントロールと比べて有意な活性はなかった。この結果からpGAF1のcDNAがGAFをコードしていることが確認されるとともに、COS細胞でcDNAを発現させると産物は培養液中へ分泌されることが明らかとなった。

【0058】(2) GAFのCHO細胞での発現

(a) 発現用プラスミドpDGAF1の構築

前記実施例5で得られたGAFの全構造を含むプラスミドpGAF1を制限酵素BamHIで切断し、1.55kbのDNA断片を単離した。一方、動物細胞用ベクターpTB399-セル・ストラクチャー・アント・フュンクショナル(Cell Struct. Funct. 12:205 (1987))を制限酵素BamHIで切断し1.2cDNA領域を除いた後、前記のGAF-cDNA(1.55kb断片)を挿入して、Abelsonマウス白血病ウイルス(MuLV)LTRの支配下に動物細胞でGAF-cDNAを発現させ得る発現用プラスミドpRGB12を構築した。さらに、これを制限酵素SalI-HindIIIで切断して発現ユニット部分(プロモーター-遺伝子-出)

(A) シグナル)をハムスター胚上胚芽細胞癌細胞系(DHFR)発現用プラスミドpTB348(セル・ストラクチャー・アント・フュンクショナル(Cell Struct. Funct. 12:205 (1987))のSV40プロモーター上流にあるSalI-HindIII部位に挿入して、プラスミドpDGAF1を構築した。プラスミドpDGAF1の構築図を図21に示す。

【0059】(b) CHO細胞における発現

CHO (dhfr⁻)細胞を10%牛胎児血清を含むHam F12培地で直径6 cmの組織培養用フラスコに播種し、翌日、同培地で培地を換した。2時間後にリン酸カルシウム法 (Graham 法、ウイルス学 (Virology) 52, 456 (1973)) によりプラスミド pDGAF1 (DNA 10 μ g) をトランスフェクトした。2日間、増殖培地で培養した後、細胞を3.5 μ g/ml プラズミンと10%透析FCSを含むDMEM培地で96穴マイクロプレート (Nunc社) にまき直し、3~4日毎の培地交換を行い、ついでdhfr⁻形質転換体を選択した。これらを3.5 μ g/ml プラズミンと5%FCSを含むDMEM培地で24穴マイクロプレート (Gibco, Flow社) に移し、各クローンを培養した。以後、用いた培地は3.5 μ g/ml プラズミンと5%FCSを含むDMEM培地である。これらのクローンの中からGAFタンパクを産生している16クローンを6 cmの組織培養用フラスコに移し、メトトレキサート (MTX) 濃度を3段階 (0, 1, 1, 10 μ M) に上げながら、10 μ M MTX耐性株を取得しGAF遺伝子の増幅をはかる。各クローンの培養上清に含まれるGAF活性を図22に示す。図中、横軸は添加した培養上清の希釈率を示している。GAF活性の高いクローンを選択し、糖鎖の付加した天然型GAF産生細胞として確立し、GAFの採取等に用いる。

【0060】実施例7 GAF遺伝子導入によるマウス

表2 GAF遺伝子導入によるA31細胞のフォーカス形成

プラスミド	トランスフェクトしたDNA量 (μ g)				
	0	1	2	5	10
pTB1055	0*	N. T.	0	N. T.	0
pRGB12	0	3	28	25	33

* : ティンティン当りのフォーカス数

N. T. : 未検討

実施例8

(1) GAFの大腸菌での発現

(a) GAF発現用プラスミド pETGAF1 の構築
前記実施例5で得られたGAFの全構造遺伝子を含むプラスミド pGAF1 を制限酵素 Kpn I-BamHI で切断し、1.25 kb の cDNA 断片を単離した。一方、1.7 kb のプロモーターを含むプラスミド pET3-c を制限酵素 Nde I-BamHI で切断し、4.6 kb の DNA を単離し、そこに前記GAF cDNA (1.25 kb 断片) と、精製GAFタンパクN末端のLeuの前Me₁が来る様に合成したDNA断片 (Nde I-Kpn I) (「配列番号11」および「配列番号12」) を挿入して、1.7 kb プロモーターの支配下に、GAF cDNA を発現させる発現用プラスミド pETGAF1 を構築した。プラスミド pETGAF1 の構築図を図23に示す。このプラスミドを用いて大腸菌 MM294

BALB/c 3T3細胞の形質転換

(1) GAF発現用プラスミド pRGB12 の構築

実施例6に記載したプラスミド pRGB12 をGAF発現用プラスミドとして、コントロールのプラスミドとしては、GAF cDNA インスертのないプラスミド pTB1055 を用いる。

(2) BALB/c 3T3細胞の形質転換

マウス BALB/c 3T3 clone A31 (サブクローン A31-1-1 (Kakunaga 法、サイエンス (Science) 204, 505 (1980))、Dr. K. Kakunaga より分与を受けた) を10%牛血清を含むDMEM培地で直径6 cmの組織培養用フラスコに1×10⁶個播種し、翌日、同培地で培地を換した。3時間後にリン酸カルシウム法 (Graham 法、ウイルス学 (Virology) 52, 456 (1973)) によりプラスミド pRGB12 および pTB1055 を1, 2, 5 および 10 μ g、それぞれトランスフェクトした。37℃で4時間インキュベーション後、15%グリセロールを含むPBS溶液で3分間刺激した。5%牛血清を含むDMEM培地で3~4日毎に半量づつ培地交換を行いながら4週間培養を続けた。培養終了後、培地を捨て、氷冷メタノールを加え15分間細胞を固定した。水洗後、ギムザ溶液で20分間染色した。ギムザ液を水洗、風乾後、染色されたフォーカスを数え、その結果を表2に示す。GAF遺伝子には、はつきりとした形質転換性があることがわかった。

【0061】

(DE3) に pLys S を形質転換することにより、GAFを発現する形質転換体 E. coli MM294 (DE3) に pLys S, pETGAF1 を得た。得られた MM294 (DE3) に pLys S, pETGAF1 を LB 培地で培養し、ソラベロビル- β -D(-)-チオガラクトシド (和光純薬 (株)、日本) で発現を誘導した後、培養液を0.6 μ l 相当の菌体を抽出蛋白質をGAFタンパクのN末端部分を認識するウサギ抗GAFポリクローナル抗体 (1:500倍希釈) を用いウエスタンブロッティング法により調べると、特異的なバンドが確認された (図24)。GAF cDNA が含まれないプラスミド pET3-c による形質転換体 MM294 (DE3) に pLys S, pET3-c ではこのバンドは産生されない。

【0062】(2) 大腸菌で産生させたGAF (rhGAF) の抽出

E. coli MM294 (DE3) に pLys S, pETGAF1 を5.0 μ g/ml のアンピシリンおよび10

$\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含むLBメデイウム中にて37°Cで振とう培養した。培養液のKlett値が120に達した時点でイソプロピル- β -D-(1- α -D-ガラクトシド)を最終濃度0.4 mMになるように添加し、さらに37°Cにて3.5時間振とう培養した。1リットルの培養液より、遠心(6,000回転/分、10分間)により集めた菌体を、氷上にて、80 mlの2 mM (pH 7.6)のメタンスルホン酸ナトリウムイソブチレート(和光純薬(株)、日本)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の卵白リゾチーム(生化学工業株式会社、東京)、および0.1 M食塩を含む20 mMトリス塩酸緩衝液で懸濁させ4°Cにて1時間置いた後、37°Cで3時間、キヌヘンとした。その懸濁液を、氷で冷却して超音波処理(ORASON社製、SONIFIK(登録商標)、米国、CELL DISRUPTOR 200出力8にて2分間)した。大腸菌抽出物を17,000回転/分、40分間の遠心により得た。

【0063】(3)大腸菌が産生するヒトGAF(rhGAF)の精製

ステップ1: 塩析沈殿

1リットルの培養液より得られた80 mlの大腸菌抽出物に27 mlの飽和硫酸アモニウム水溶液を添加混合後、4°Cにて1昼夜放置した。その後17,000回転/分、40分間の遠心にて上清を得た。

ステップ2: 疎水カラムクロマトグラフィー

ステップ1で得られた100 mlの遠心上清を、あらかじめ25%飽和硫酸を含む20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.6)で平衡化したButyl-Toyopearl 650 M(セパト容積50 ml、内径2.5 cm・長さ10 cm、東洋株式会社製、東京)に通した(80 ml/時間、4°C)。12.5%飽和硫酸と2 mM α -PMSFを含む20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.6)で充分塩体を洗浄後、1.5%グリセリン、0.1%CHAPSおよび2 mM α -PMSFを含む20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.6)でrhGAF蛋白を含む画分を得た

(80 ml/時間、10 ml/フラクション、4°C)

(図25)

ステップ3: スパリアアモニウム高速液体カラムクロマトグラフィー

ステップ2でrhGAF蛋白を含む画分(フラクション44から47)をプールした(40 ml)。この40 mlの溶液のうち36 mlを、HR-894(内径8 mm・長さ50 mm、昭和電工、日本)を装置した高速液体クロマトグラフィー(Gilson Medical Electronics社製、フランス)にかけた。レシに吸着したたんぱく質は、NaClの濃度を直線的に上昇させることにより、流速2 ml/分で溶出し画分(2 ml/フラクション)した。用いた緩衝液はAが0.4 M NaCl、0.1%CHAPSと1.5%グリセリンを含む10 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.6)で、Bが2 M NaCl、0.1%CHAPSと1.5%グリセリンを含む10 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.6)である。溶出プログラムは次に記すとおりで行った。すなわち0分(100%A)→70分(75%A+25%B)→75分(100%B)→80分(100%B)→85分(100%A)として行った(図26)。カラム温度は室温であった。

【0064】蛋白の溶出画分の1 μl を2-メルカプトエタノール存在下でSDS-ポリアクリルアミド電気泳動し(ゲル濃度12.5%)、銀染色した結果を図27に示す。食塩濃度を上昇させることにより溶出されてきた画分は、27 kDaの単一なバンドを与えた。またこの27 kDaのたんぱく質はN末端部分と結合するウサギ抗GAFポリクローナル抗血清で認識された。(図28)。フラクション27から42をプールした。

【0065】(4)精製の要約

1リットルのE. coli MM294(DE3)/pLysS, pETGAF1培養液から出発したrhGAFの精製の要約を表3に記す。

表3

サンプル	全たん白量	全活性	比活性	活性回収率	精製倍数
	(mg)	(U)	(U/mg)	(%)	
大腸菌抽出物	672	$4.16 \cdot 10^7$	$6.19 \cdot 10^1$	100	1
25%飽和硫酸上清	210	$4.35 \cdot 10^7$	$2.07 \cdot 10^2$	105	3.3
Butyl-Toyopearl	37.6	$4.10 \cdot 10^6$	$1.09 \cdot 10^5$	10	1.8
スパリアHPLC	4.5	$3.31 \cdot 10^6$	$7.35 \cdot 10^5$	8.0	12

生物活性は、参考例1に記載した方法で行った。生物活性の単位はトリチウムチミジンの50%取り込み値を示す細胞数の希釈率の逆数とした。なお、トリチウムチミジン(100%)取り込み値は、10%ウシ胎児血清により誘導される値とした。蛋白質量はMicro BCA キット(PIERCE社製、米国)により、ウシ血清アルブミンを対照にして算定した。

【0066】

実施例9 因子の各種培養細胞に対する作用(2)

(1)クリア細胞に対する増殖促進活性

実施例8-(3)に記載した方法で得られたrhGAFは、クリア細胞に対し増殖促進活性を有している(図29)。図中横軸はGAF濃度を示す。なおクリア細胞に対する増殖促進活性の測定方法については、参考例1に

記載した方法に従って行った。

(2) 線維芽細胞に対する増殖促進活性

実施例8-(1)に記載した方法で得られたrhGAFは、線維芽細胞バウマンALB-3T3 clone A3-1細胞に対し増殖促進活性を有していた(図30)。図中横軸はGAF濃度を示す。なお線維芽細胞A3-1に対する増殖促進活性の測定については、実施例2-(4)に記載した方法に従って行った。

(3) ラット血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性

実施例8-(3)に記載した方法で得られたrhGAFは、ラット血管平滑筋細胞に対し増殖促進活性を有していた(図31)。図中横軸はGAF濃度を示す。なおラット血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性の測定については、以下に記載する方法で行った。ラット初代培養血管平滑筋細胞を10%胎牛血清を含むイーグルMEM培地で2×10⁶個のライオンマイクロタイタープレート(4底)に1あたり3×10³個を100μlの培地に挿入して培養した。翌日、各ウェルより80μlの培地を廃棄し、各ウェルに血清を含まないイーグルMEM培地を180μl添加した。2日間培養した後も各ウェルより20μlの培地を廃棄した。その後、0.1%の血清アルブミンを含むDMEM培地で適量に希釈したテストサブスタンスの20μlを各ウェルに添加後、1晩培養した。翌朝、各ウェルに1μCiのトリチウムチミン(5Ci/mmol, 1mCi/ml, RCC-Amersham)を添加後、さらに5時間培養した。培養後、各ウェルの培地を廃棄後、各ウェルに100μlの0.5トリチンと0.01%EDTAを含むPBSを添加し、数分の間室温にて放置した。顕微鏡で細胞が遊んでいることを確認した後、各細胞をタイマー・クセル・ハーベスター(Flow Laboratories社製, Virginia, USA)を用いてガラスファイバーフィルター(大日本製薬株式会社製)上に集めて洗浄後、細胞に取り込まれたトリチウムチミンの放射能を液体シンチレーション・カウンターにて測定した。

【0067】

(4) ヒトさい帯血管内皮細胞に対する作用

実施例8-(3)に記載した方法で得られたrhGAFは、ヒトさい帯血管内皮細胞に対して増殖促進活性を有していなかった(図32)。図中横軸はGAFまたはbFGFのたん白濃度を示す。なおヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性の測定については、実施例2-(5)に記載した方法に従って行った。

【0068】

(5) rhGAFの巨核球系コロニー刺激因子活性
BALB/cヒスチダウス骨髓細胞は、20%ワシ胎児血清(FCS)含有イソラック改良ダルベッコ培地(IMDM)に2×10⁶個/mlとなるように懸濁し、FCSをコートしたガラス・ク培養皿中で37℃、1時間イ

ンキュベーションして付着性細胞を除去した。得られた非付着性骨髓細胞は、IMDMで3回洗浄した後実験に供した。細胞を1%NeutridomaSP(bio-nringer mannheim社)含有IMDMに懸濁し、ヒトインターフェロンGAF(rhGAF)とともに1×10⁶個ずつ96穴平底プレートに播種した。rhGAFは0.6M NaCl, 15%グリセリン, 0.1%CHAPS, 10mM Tris-HCl (pH7.6)に125μg/ml溶解したものをIMDMで希釈して使用し、GAFを含まない緩衝液も同様に希釈して実験系に添加した。また、ポリメチルメチルシロキサンとしてマウスリコニンヒンタIL-3(mrIL-3)(Genzyme社)を用いた。これらを、37℃、5%CO₂を含む空気存在下で4日間培養した。その後、5mg/ml MTT (SIGMA社)含有PBS溶液を20μl添加し、37℃で5時間培養した。10%SDS, 0.01N HCl溶液を100μl添加し、37℃でさらに1晩インキュベーションした後、590nmの吸光度を測定し、骨髓細胞の増殖を調べ、図33に示した。一方、同様に調製した細胞を37℃、5%CO₂を含む空気存在下で7日間培養した。5%グルタルアルデヒド含有PBS溶液を50μl添加して2000rpmで5分間遠心し、細胞を固定した。0.1Mリノ酸緩衝液(pH6.0)で一度洗浄後、アセチルコリンエステラーゼ染色(緩生化学実験講座「8 血液」巻, 149頁参照)にて巨核球を染色し、ウェルあたりの巨核球数を倒立顕微鏡下で数え、図34に示した。これらの結果から、rhGAFにはマウス骨髓細胞を増殖させる活性があること、さらに骨髓細胞中の巨核球系に作用してこの細胞を増殖分化させる活性があることが明らかとなった。

【0069】

【0070】

【配列表】

配列番号(SEQ ID NO): 1

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 208

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸(amino acid)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状(linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): タンパク質(protein)

ハイボセチカル配列(HYPOTHETICAL): No

起源(ORIGINAL SOURCE)

生物名(ORGANISM): Homo sapiens

ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n

組織の種類(TISSUE TYPE): skin

細胞の種類(CELL TYPE): fibroblast

直接起源(IMMEDIATE SOURCE):

ライブラリー名(LIBRARY): Human foreskin cDNA library

クローン名(CLONE): pGAF1

配列:

Met Ala Pro Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala
 5 10 15
 Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu
 20 25 30
 Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly
 35 40 45
 Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
 50 55 60
 Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
 65 70 75 80
 Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
 85 90 95
 Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
 100 105 110
 Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
 115 120 125
 Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
 130 135 140
 Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
 145 150 155 160
 Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
 165 170 175
 Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
 180 185 190
 Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser
 195 200 205

【0071】配列番号(SEQ ID NO) : 2
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 1493
 配列の型(SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)
 鎖の数(STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)
 トポロジ(TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)
 配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA
 ハイボセティカル配列(HYPOTHETICAL) : No
 アンチセンス(ANTI-SENCE) : No
 起源(ORIGINAL SOURCE)

生物名(ORGANISM) : Homo sapiens
 ハプロタイプ(HAPLO TYPE) : 2n
 組織の種類(TISSUE TYPE) : skin
 細胞の種類(CELL TYPE) : fibroblast
 直接起源 (IMMEDIATE SOURCE) :
 ライブラリー名(LIBRARY) : Human foreskin cDNA libra
 ry
 クローン名(CLONE) : pGAF1

配列:

TGAAACAGCA GATTACTTTT ATTTATGCAT TTAATGGATT GAAGAAAAGA ACCTTTTTTT 60
 TTCTCTCTCT CTCTGCAACT GCAGTAAGGG AGGGGAGTTG GAATACCTC GCCTAATATC 120
 TCCTGGGTTG ACACCATCAT TATTGTTTAT TCTTGTCCTC CAAAAGCCGA GTCCTCTGAT 180
 GGCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATATT CGGTCTGCAG GATCGGTAC CGTTTGGGAA 240
 TTGCCCCGTG TTGCCGGTGG ACAGCCCGGT TTTGTTAAGT GATCACCTGG GTCAGTCCGA 300
 AGCAGGGGCG CTCCCAGGGG GACCCGCGGT CACCGACTTG GATCATTTAA AGGGGATTCT 360
 CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACCTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC 420
 TATCCAGAGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGGCTT CTGGAATTTA TCAGTATAGC 480
 AGTGGGCTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA 540
 GGGGCGAGCTG TATGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA 600
 AGAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG 660
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA 720
 CCAGAAATTC ACACATTTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GACAAAGTAC CTGAACTGTA 780
 TAAGGATATT CTAAGCCAAA GTTGACAAAG ACAATTTCTT CACTTGAGCC CTIAAAAAAG 840

TAACCACIAT AAAGGTTTCA CCGGGTGGGT TCTTATIGAT TCGTGTGTG ATCACATCAG 900
 CTCCACIGTT GCCAACTTT GTCCATGCA TAACTATGA TGGAGCCTTG GATGGGAATA 960
 TGCTGATTT GTTCTGCACT TAAAGGCTTC TCCTCTGGA GGGCTCCIA GGGCCACTTG 1020
 CTTGATTAT CATGAGAGAA CAGGAGAGAG AGAGAGACTG AGCCTAGGA GTGTGTGTAT 1080
 GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT ATGTGTGTAG CGGAGATGT GGGCGGAGCG 1140
 AGAGCAAAAG GACTGCGGCC TGATGCATGC TGGAAAAAGA CAGCCTTTC ATTTCTGATC 1200
 AGTTGTACTT CATCCATAT CAGCACAGCT GCCATACIT CACTTATCAG GATTCGGCT 1260
 GGTGGCTGC GCGAGGTGC AGTCTTACTT AAAAGACIT CAGTTAATTC TCACIGGTAT 1320
 CATGCGAGTG AACTTAAAC AAAGACCTCT TAGTAAAAA TAAAAATAA TAAAAATAA 1380
 AATAAAAAA AGTTAAATTT ATTTATAGAA ATTCCAAAA AAAAAATAA AAAAAATAA 1440
 AAAAAATAA AAAAAATAA AAAAAATAA AAAAAATAA AAAAAATAA AAA 1493

【0072】配列番号(SEQ ID NO): 3

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 21

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸 (amino acid)

鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): タンパク質 (protein)

ハイポセタイカル配列(HYPOTHETICAL): No

アンチセンス(ANTI-SENCE): No

フラグメント型(FRAGMENT TYPE): N-terminal fragment

起源(ORIGINAL SOURCE)

配列:

Ala Asp Xaa Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Xaa Gly Pro
 5 10 15

Ala Val Thr Asp Leu
 20

【0073】配列番号(SEQ ID NO): 4

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 13

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸 (amino acid)

鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): タンパク質 (protein)

ハイポセタイカル配列(HYPOTHETICAL): No

アンチセンス(ANTI-SENCE): No

フラグメント型(FRAGMENT TYPE): N-terminal fragment

起源(ORIGINAL SOURCE)

配列:

Xaa Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val Pro (Ser) Leu
 5 10

【0074】配列番号(SEQ ID NO): 5

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 23

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸 (amino acid)

鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): タンパク質 (protein)

ハイポセタイカル配列(HYPOTHETICAL): No

フラグメント型(FRAGMENT TYPE): N-terminal fragment

起源(ORIGINAL SOURCE)

生物名(ORGANISM): Homo sapiens

配列:

生物名(ORGANISM): Homo sapiens

ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n

組織の種類(TISSUE TYPE): brain

細胞の種類(CELL TYPE): glioma

セルライン(CELL LINE): NMC-G1

配列の特徴(FEATURE)

特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD): E

3 Xaa= His または Pro

11 Xaa= undetermined

生物名(ORGANISM): Homo sapiens

ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n

組織の種類(TISSUE TYPE): brain

細胞の種類(CELL TYPE): glioma

セルライン(CELL LINE): NMC-G1

配列の特徴(FEATURE)

1 Xaa = undetermined

12 (Ser) = predicted

特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD): E

ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n

組織の種類(TISSUE TYPE): brain

細胞の種類(CELL TYPE): glioma

セルライン(CELL LINE): NMC-G1

配列の特徴(FEATURE)

1 Xaa= Leu または Ala

20 (Pro) = predicted

21 Xaa = undetermined

特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD): E

Xaa Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro Phe
 5 10 15
 Gly Asn Val (Pro) Xaa Leu Leu
 20

【0075】配列番号(SEQ ID NO):6
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):25
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)
 配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)
 ハイボセテカル配列(HYPOTHETICAL):Yes
 アンチセンス(ANTI-SENSE):No
 配列の特徴(FEATURE)
 11,14 I = inosine
 配列:

AAGGATCCG TGGTAAATAT TTYG 25

【0076】配列番号(SEQ ID NO):7
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):25
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)
 配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid)

配列:

GGATCCG TGGTAAATAT TTYG 25

【0078】配列番号(SEQ ID NO):9
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):30
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)
 配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)
 ハイボセテカル配列(HYPOTHETICAL):Yes
 アンチセンス(ANTI-SENSE):No
 配列:

TGGGGAACIA TTTCGGGGTG CAGGATGCGG 30

【0079】配列番号(SEQ ID NO):10
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):30
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)

配列:

TAAGTTAGGT GAAGTTGGGA ACTATTTCGG TGTGCAAGAT GCGTAC 47

【0081】配列番号(SEQ ID NO):12
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):41
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)

配列:

CGCATCCTGC ACACCGAAAT AGTTCCCAAC TTCACCTAAC A 41

c acid) 合成DNA(synthetic DNA)
 ハイボセテカル配列(HYPOTHETICAL):Yes
 アンチセンス(ANTI-SENSE):Yes
 配列の特徴(FEATURE)
 14,20,23 I = inosine
 配列:

AAGAATTCAC RTTCCRAAI GGIAC 25

【0077】配列番号(SEQ ID NO):8
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):59
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)
 鎖の数(STRANDEDNESS):二本鎖(double)
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)
 配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid)
 (PCR product from genomic DNA)
 ハイボセテカル配列(HYPOTHETICAL):No
 アンチセンス(ANTI-SENSE):No
 起源(ORIGINAL SOURCE)
 生物名(ORGANISM):Homo sapiens

配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)
 ハイボセテカル配列(HYPOTHETICAL):Yes
 アンチセンス(ANTI-SENSE):Yes
 配列:

ACGTTGCCGA AGGGGACCGC ATCCTGCACC 30

【0080】配列番号(SEQ ID NO):11
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):47
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)
 配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)
 ハイボセテカル配列(HYPOTHETICAL):No
 アンチセンス(ANTI-SENSE):No

配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)
 ハイボセテカル配列(HYPOTHETICAL):No
 アンチセンス(ANTI-SENSE):Yes

【図面の簡単な説明】

【図1】ヘパリンセファローフ（登録商標）CL-6Bカラムクロマトグラフィー（実施例1②ステップ1）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図2】セファールのS-200HRカラムクロマトグラフィー（実施例1③ステップ3）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図3】ヘパリンセファローフ（登録商標）CL-6Bカラムクロマトグラフィー（実施例1④ステップ4）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図4】HR-894ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグラフィー（実施例1⑤ステップ5）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図5】Vylac C4高速液体カラムクロマトグラフィー（実施例1⑥ステップ6）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図6】精製グリダ活性化因子（NMC-G1由来）のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図である。

【図7】精製グリダ活性化因子のグリダ細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図8】NMC-G1由来精製グリダ活性化因子のグリダ細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図9】グリダ活性化因子（NMC-G1由来）によるグリダ細胞数の増加を示す図である。

【図10】グリダ活性化因子（NMC-G1由来）によるグリダ細胞へのトリチウムラベル取り込み促進の経時変化を示す図である。●はGAF添加群を○はGAF無添加のコントロール群を示す。

【図11】精製グリダ活性化因子（NMC-G1由来）の線維芽細胞マウスBALB/3T3 clone A31細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図12】NMC-G1由来精製グリダ活性化因子の線維芽細胞マウスBALB/3T3 clone A31細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図13】精製グリダ活性化因子（NMC-G1由来）のヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図14】精製グリダ活性化因子（NMC-G1由来）のラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞株に対するトリチウム取り込み促進活性を示す図である。

【図15】グリダ活性化因子（NMC-G1由来）活性の熱・酸安定性を示すグラフである。

【図16】aFGF、bFGFとグリダ活性化因子（N

MC-G1由来）間の免疫学的交差性を示す図である。

【図17】GAF（NMC-G1由来）のビスチニル化、コウサリンAおよびアビティンとビスチニル化ペルオキシダーゼを用いた染色の図である。

【図18】GAF（NMC-G1由来）のN-グリカナーゼ処理の結果である。

【図19】GAFのcDNAの塩基配列とそれにより規定されるアミノ酸配列を示す図である。

【図20】pGAF1をCOS-7細胞で発現させ、グリダ細胞に対する増殖促進活性を測定した結果である。

【図21】プラスミドpDGAF1の構築を示す図である。

【図22】スクリーンセード耐性CHO細胞培養上清に含まれるGAF活性を示す図である。

【図23】プラスミドpETGAF1の構築を示す図である。

【図24】MM294 (DE3) *Escherichia coli* pETGAF1の抽出物中に含まれるrhGAFをウエスタンブロッティング法により染色した図である。

【図25】疎水カラムクロマトグラフィー（実施例7（3）ステップ2）でのたん白の溶出パターンを示す図である。

【図26】ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグラフィー（実施例8（3）ステップ3）でのたん白の溶出パターンを示す図である。

【図27】精製rhGAFのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図である。

【図28】精製rhGAFをウエスタンブロッティング法により染色した図である。

【図29】精製rhGAFのグリダ細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図30】精製rhGAFの線維芽細胞株BALB/3T3 clone A31細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

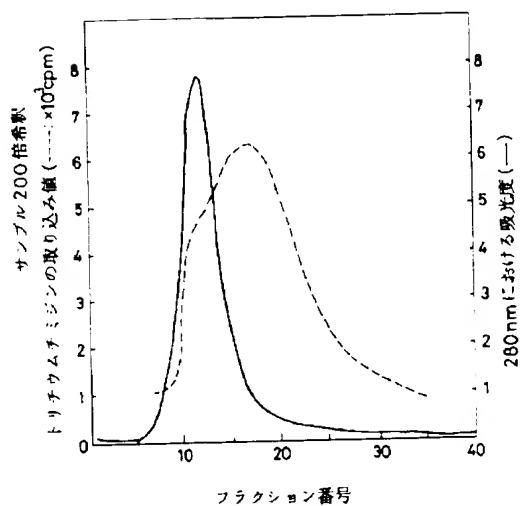
【図31】精製rhGAFのラット血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図32】精製rhGAFのヒトさい帯血管内皮細胞増殖に対する作用を示す図である。

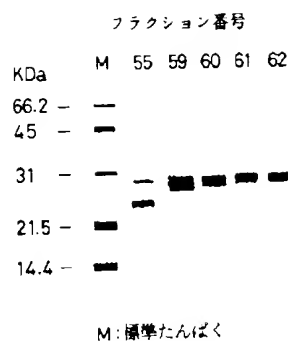
【図33】精製rhGAFのマウス骨髄細胞増殖に対する作用を示す図である。

【図34】精製rhGAFのマウス骨髄細胞中巨核芽球に対する作用を示す図である。

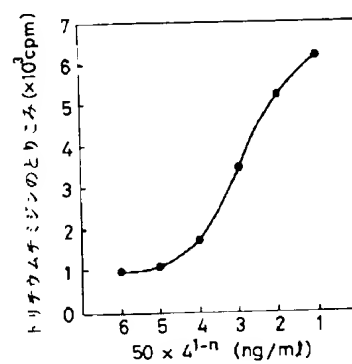
【図1】



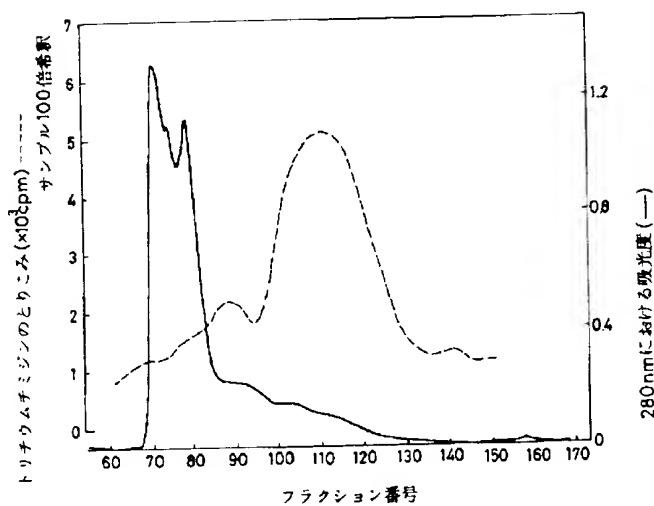
【図6】



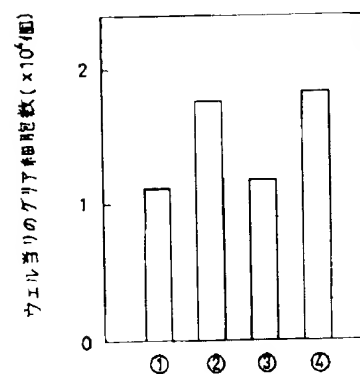
【図7】



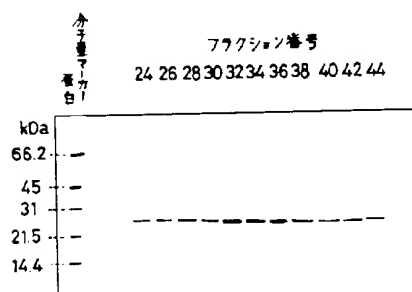
【図2】



【図9】

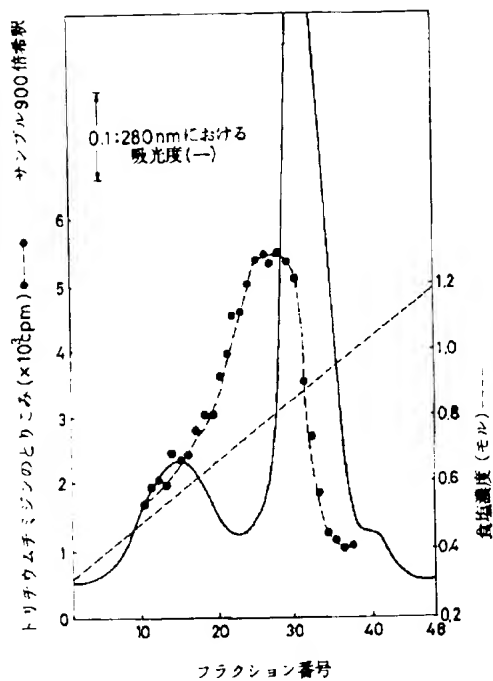


【図27】

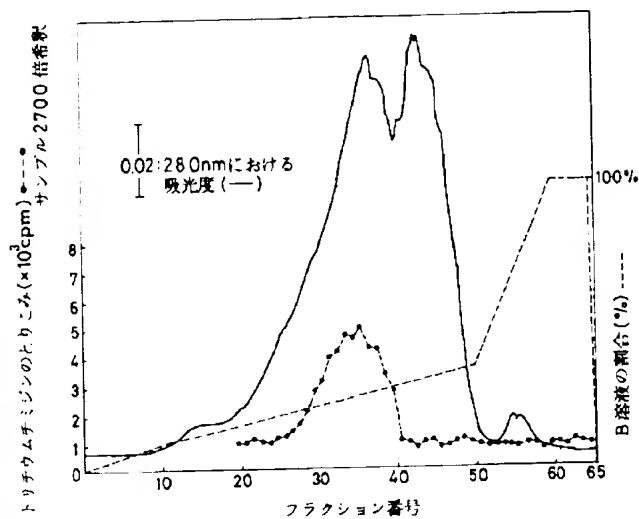


- ① 対照群
② GAF 添加群
③ ヘパリン添加群
④ GAF およびヘパリン添加群

【図3】

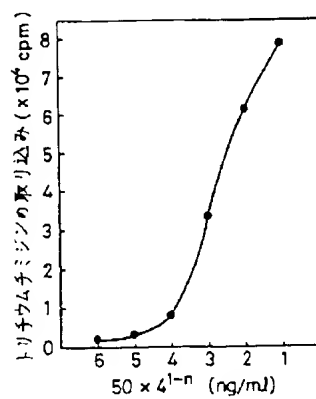
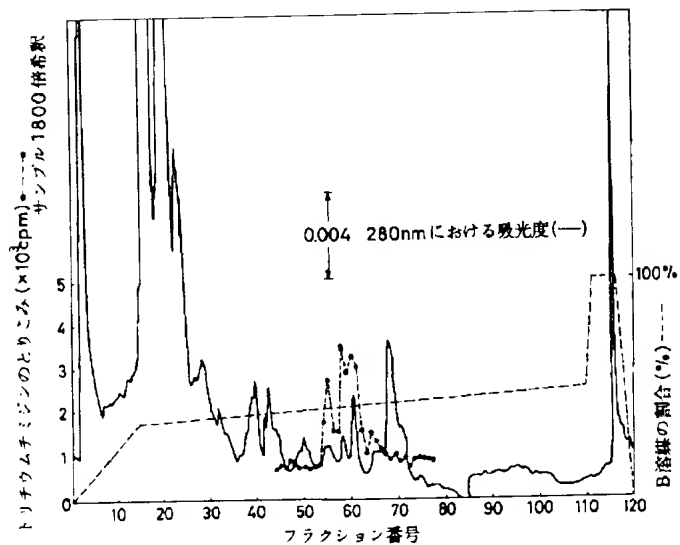


【図4】

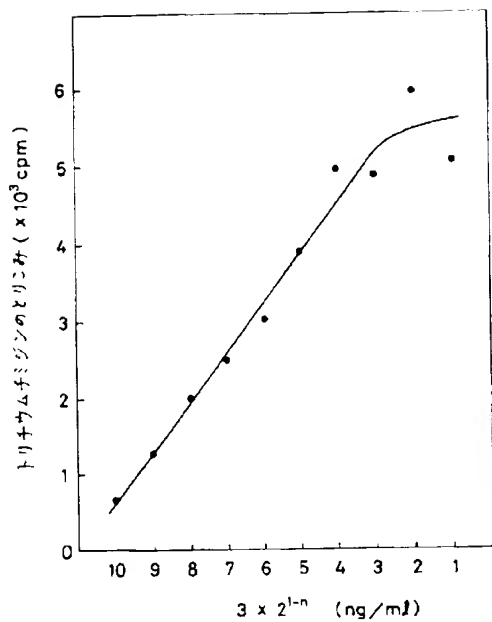


【図11】

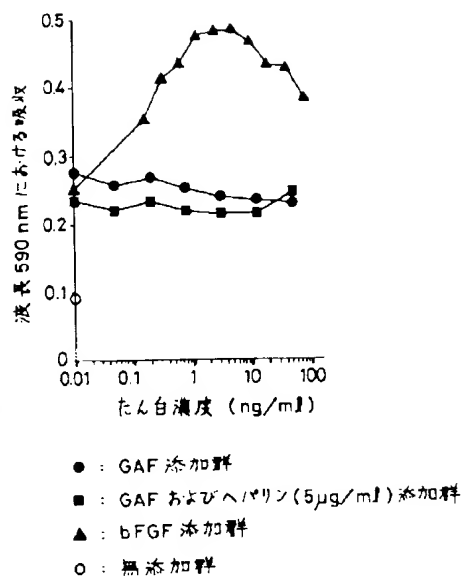
【図5】



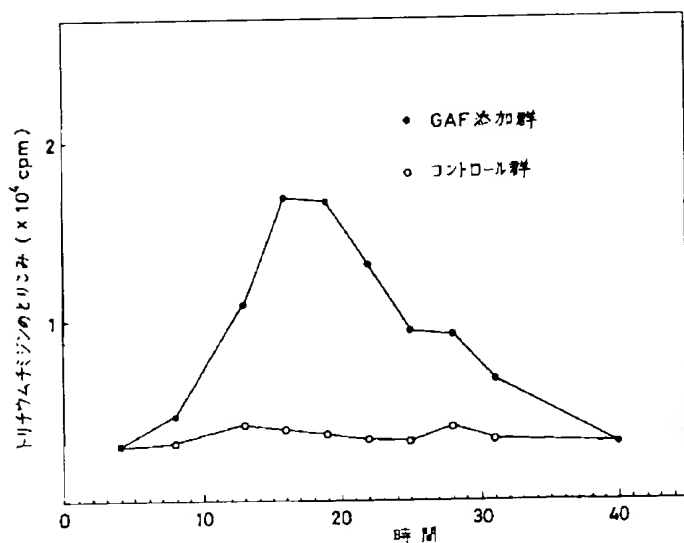
【図8】



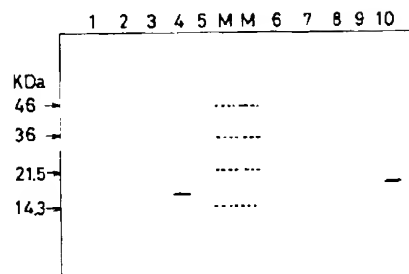
【図13】



【図10】

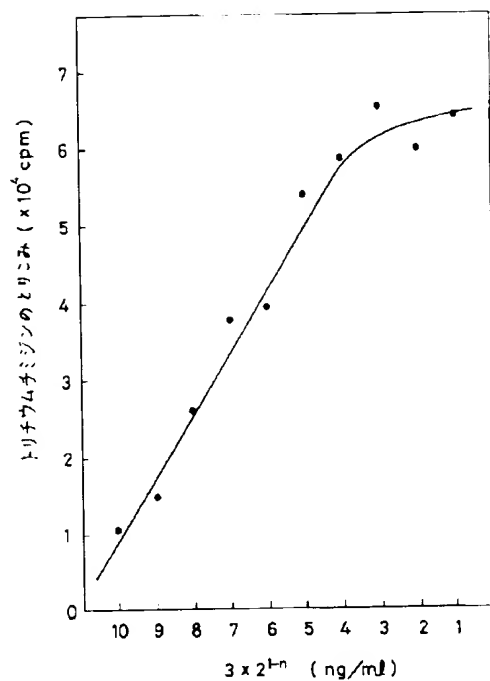


【図16】

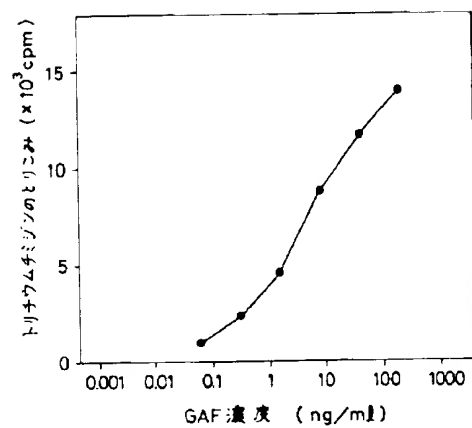


1,6:分子量 25,000GAF
 2,7:分子量 29,000GAF
 3,8:分子量 30,000GAF
 4,9: acidicFGF
 5,10: basicFGF
 1~5: 抗acidicFGF ウサギポリクローナル抗血清
 6~10: 抗basicFGF ウサギポリクローナル抗血清
 M: 有色標準たん白質

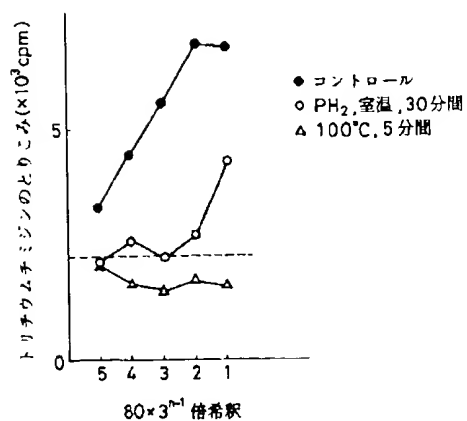
【図12】



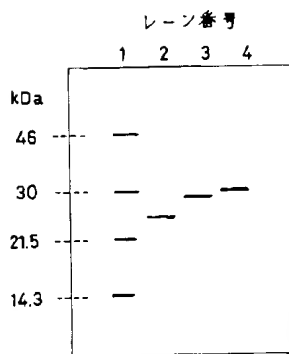
【図14】



【図15】

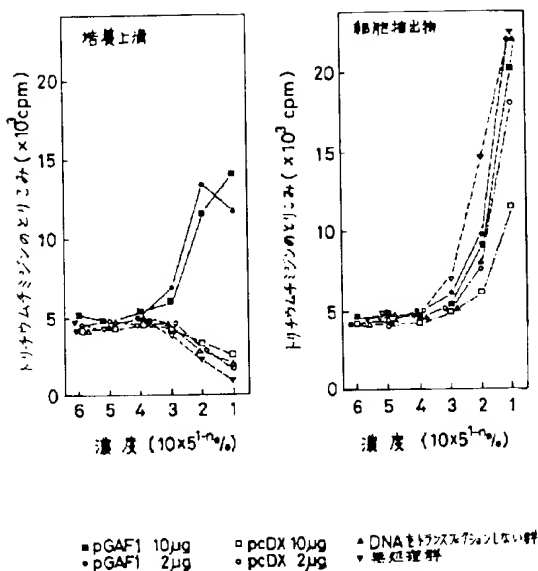
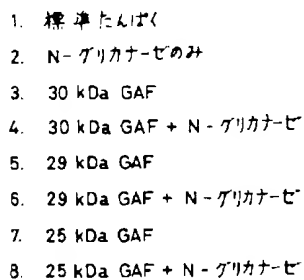


【図17】



1. 有色標準たんぱく (アマーシューム社製, 英国)
2. 25kDa GAF
3. 29kDa GAF
4. 30kDa GAF

【图 20】



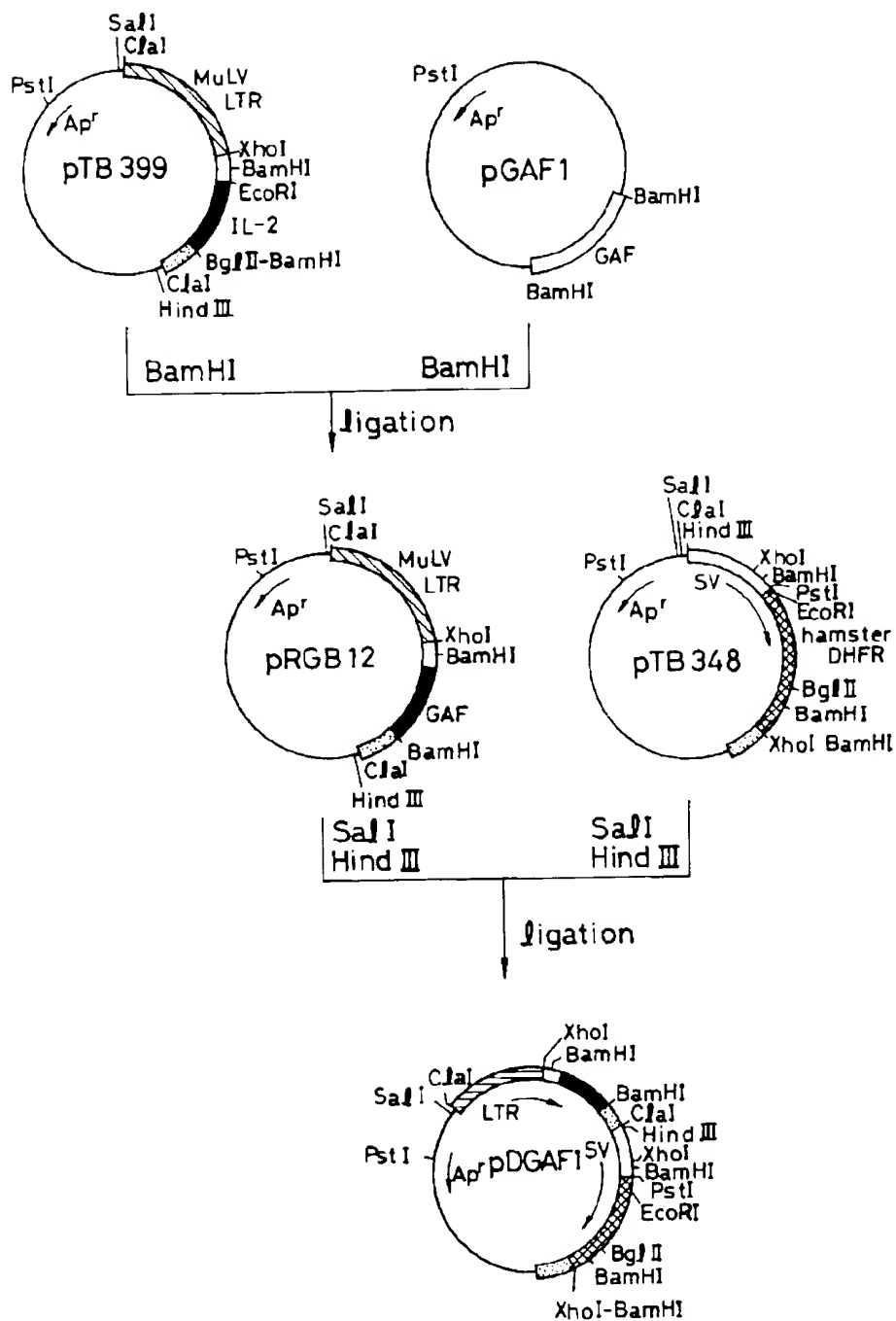
【例 19-2】

910	920	930	940	950	960
CTCCACTGTTGCCAAACTTTGTCCGATGCATAATGTATGATGGAGGCTTGGATGGGAATA					
970	980	990	1000	1010	1020
TGCTGATTTTGTCTTGCACCTTAAAGGCTTCTCCTCCTGGAGGGCTGCCTAGGGCCACTTG					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CTTGATTTATCATGAGACAAGAGGAGAGACAGAGACTGAGCGCTAGGAGTGTGTGAT					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGTGTGTAGCGGAGATGTGGCGGAGCG					
1150	1160	1170	1180	1190	1200
AGAGCAAAAGGACTGCGGCCTGATGCATGCTGGAAAAACACACGCTTTTCATTTCTGATC					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
AGTTGTACTTCATCCTATATCAGCACAGCTGCCATACCTTCGACTTATCAGGATTCTG3CT					
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GGTGGCCTGCGGAGGGTGCAGTCTTACTTAAAGACTTTCAGTTAATTCTCACTGGTAT					
1330	1340	1350	1360	1370	1380
CATCGCAGTGAACCTTAAAGCAAAGACCTCTTAGTAAAAATAAAAAAAAAATAAAAAATAA					
1390	1400	1410	1420	1430	1440
AAATAAAAAAAGCTTAAATTTTATATAGAAATTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA					
1450	1460	1470	1480	1490	
AAA					

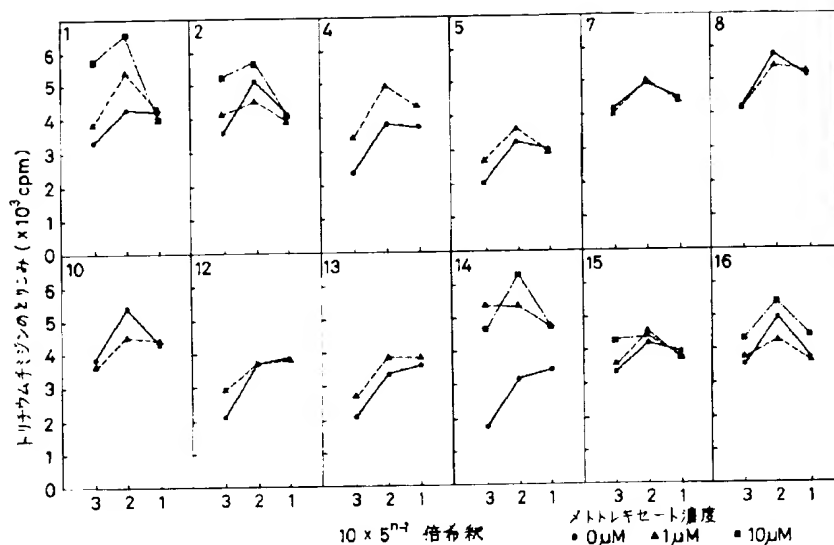
【図19-1】

10 20 30 40 50 60
 TGAACACAGCAGATTACTTTTATTTATGCATTTAATGGATTGAAGAAAAGAACCCTTTTTTT
 70 80 90 100 110 120
 TTCTCTCTCTCTCTGCAACTGCAGTAAGGGAGGGGAGTTGGATATACCTCGCCTAATATC
 130 140 150 160 170 180
 TCCTGGGTTGACACCATCATTATTTGTTTATTCTTGTGCTCCAAAAGCCGAGTCTCTGAT
 Me
 190 200 210 220 230 240
 GGCTCCCTTAGGTGAAGTTGGGAACATTTTCGGTGTGCAGGATGCGGTACCGTTTGGGAA
 lAlaProLeuGlyGluValGlyAsnTyrPheGlyValGlnAspAlaValProPheGlyAs
 250 260 270 280 290 300
 TGTGCCCGTGTGCCCGTGGACAGCCCGTTTTGTTAAGTGACCACCTGGGTGAGTCCGA
 nValProValLeuProValAspSerProValLeuLeuSerAspHisLeuGlyGlnSerGl
 310 320 330 340 350 360
 ACCAGGGGGGCTCCCCAGGGGACCCGAGTCACGGACTTGGATCATTTAAAGGGGATTCT
 uAlaGlyGlyLeuProArgGlyProAlaValThrAspLeuAspHisLeuLysGlylleLe
 370 380 390 400 410 420
 CAGGGCGAGGCAGCTATACTGCAGGACTGGATTTCACTTAGAAATCTTCCCAATGGTAC
 uArgArgArgGlnLeuTyrCysArgThrGlyPheHisLeuGluillePheProAsnGlyTh
 430 440 450 460 470 480
 TATCCAGGGAACCCAGGAAAGACCACAGCCGATTTGGCATTCTGGAATTTATCAGTATAGC
 rlleGlnGlyThrArgLysAspHisSerArgPheGlylleLeuGluPheilleSerilleAl
 490 500 510 520 530 540
 ACTGGGCTGGTCAGCATTGAGGCGTGGACAGTGGACTCTACCTCGGGATGAATGAGAA
 aValGlyLeuValSerilleArgGlyValAspSerGlyLeuTyrLeuGlyMetAsnGluLy
 550 560 570 580 590 600
 GGGGGAGCTGTATGGATCAGAAAACTAACCAGAGTGTGTATTACAGAGAACAGTTTGA
 sGlyGluLeuTyrGlySerGluLysLeuThrGlnGluCysValPheArgGluGlnPheGl
 610 620 630 640 650 660
 AGAAAACTGGTATAATACGTACTCGTCAAACCTATATAAGCACGTGGACACTGGAAGGCG
 uGluAsnTrpTyrAsnThrTyrSerSerAsnLeuTyrLysHisValAspThrGlyArgAr
 670 680 690 700 710 720
 ATACTATGTTGCATTAATAAAGATGGGACCCGAGAGAAGGGACTAGGACTAAACGGCA
 gTyrTyrValAlaLeuAsnLysAspGlyThrProArgGluGlyThrArgThrLysArgHl
 730 740 750 760 770 780
 CCAGAAATTCACACATTTTTTACCTAGACCAGTGGACCCGACAAAGTACCTGAACCTGTA
 sGlnLysPheThrHisPheLeuProArgProValAspProAspLysValProGluLeuTy
 790 800 810 820 830 840
 TAAGGATATTCTAAGCCAAAGTTGACAAAGACAATTTCTTCACTTGAGCCCTTAAAAAAG
 rLysAspilleLeuSerGlnSerEnd
 850 860 870 880 890 900
 TAACCACTATAAAGGTTTCACGCGGTGGTTCTTATTGATTGGCTGTGTCATCACATCAG

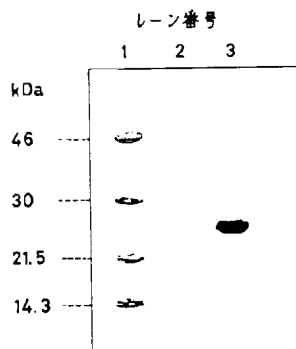
【図21】



【図22】

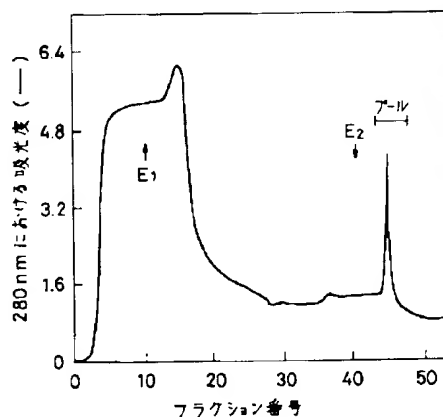


【図24】



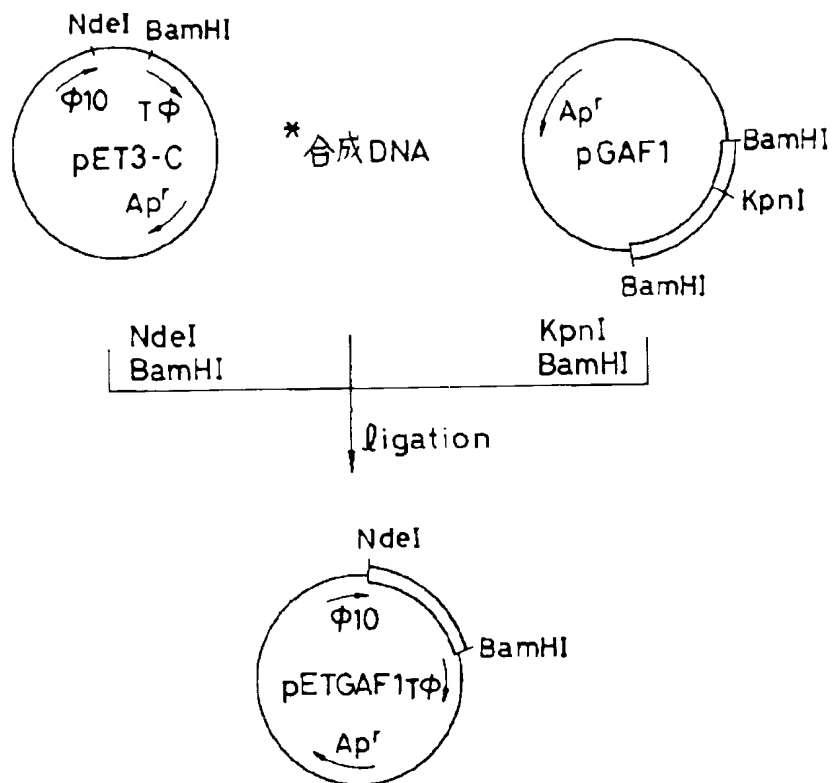
1. 有色標準たんぱく (アマーシャム社製, 英国)
2. MM294(DE3)/pLys, pET3-C抽出物
3. MM294(DE3)/pLys, pETGAF1の抽出物

【図25】



- E1: 12.5% 飽和硫酸と 2mM aPMSFを含む
20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6)
- E2: 15% グリセリン, 0.1% CHAPS および 2mM
aPMSFを含む 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6)

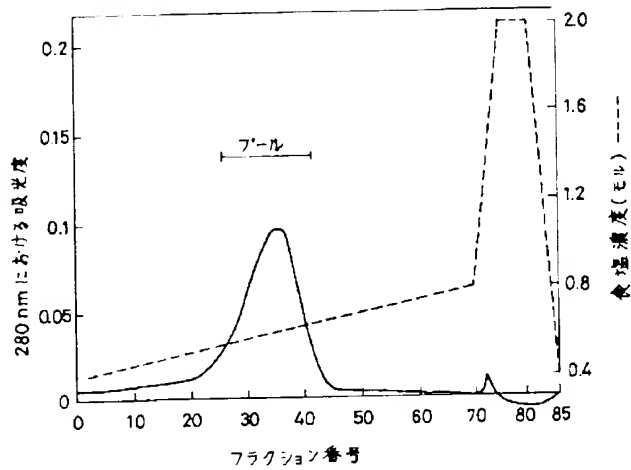
【図23】



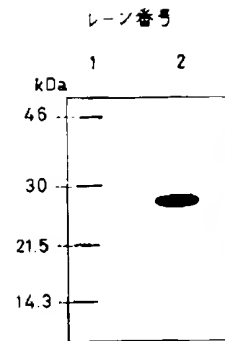
*

5'-TATGTTAGGTGAAGTTGGGAAGTATTTCCGGTGTGCAGGATGCGGTAC-3'
 ACAATCCACTTCAACCCTTGATAAAGCCACACGTCCTACGC

【図26】

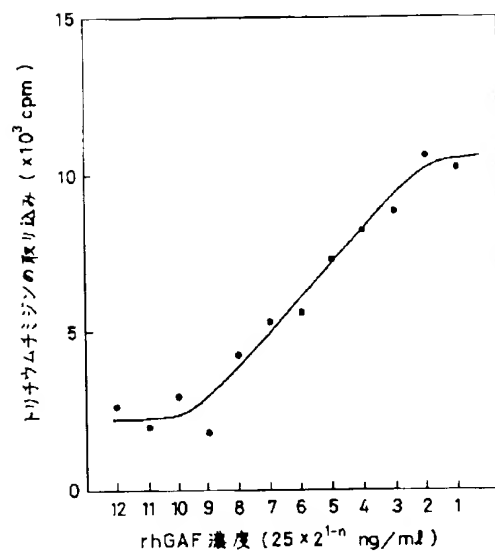


【図28】

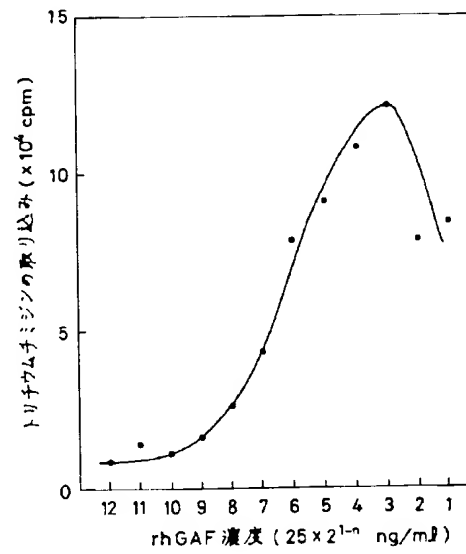


1. 有色標準たん白 (アマノ社製、美品)
2. 精製 rhGAF

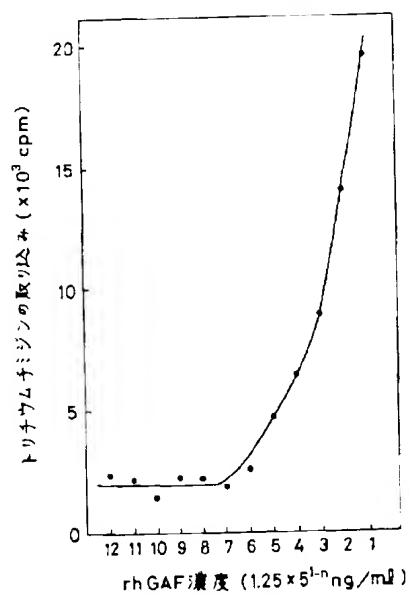
【図29】



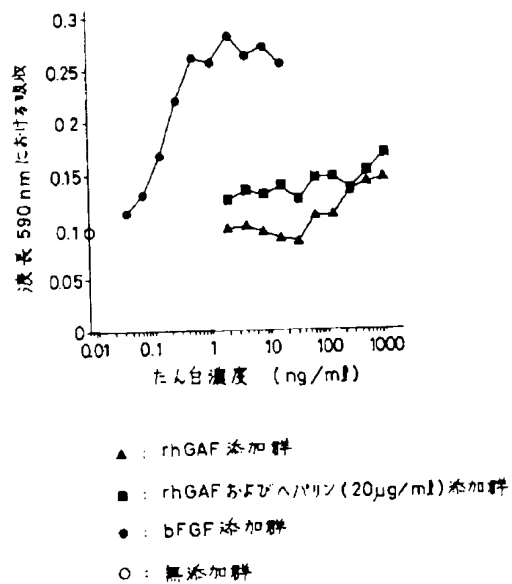
【図30】



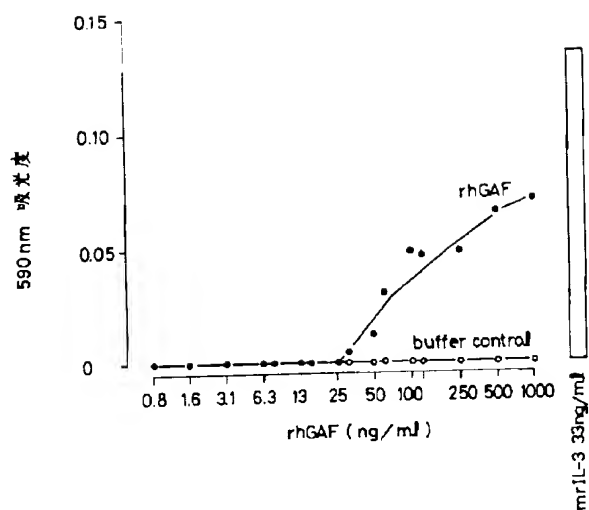
【図31】



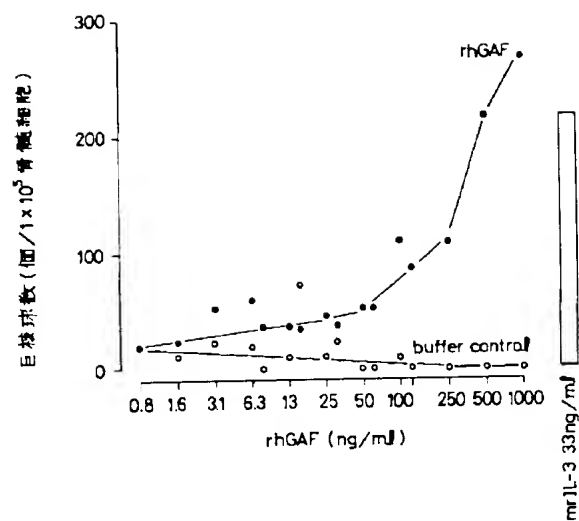
【図32】



【図33】



【図34】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

C 1 2 N 15/18

C 1 2 P 21/02

// A 6 1 K 37/02

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

識別記号

Z N A

庁内整理番号

H 8214-4B

A A B

8314-4C

A D S

F 1

技術表示箇所